

**EFFECTO FUNDADOR DE LA MUTACIÓN p.G301C EN EL GEN GALNS EN PACIENTES  
COLOMBIANOS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA**

**Leidy Lorena Díaz Ordóñez, MSc.  
Magister en biotecnología – Universidad Icesi**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2024**

**EFFECTO FUNDADOR DE LA MUTACIÓN p.G301C EN PACIENTES COLOMBIANOS CON  
MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA**

**Leidy Lorena Díaz Ordóñez, MSc.  
Magister en biotecnología – Universidad Icesi**

**Tesis doctoral presentada como requisito para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**Director:  
Wilmar Saldarriaga Gil, MD. PhD.**

**Director:  
Harry Pachajoa, MD. PhD.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA CIENCIAS BÁSICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
SANTIAGO DE CALI  
2024**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, cuya guía y fortaleza me permitieron alcanzar esta meta. A mis padres y hermanas, por su amor, apoyo y confianza incondicional. A mi esposo e hijo, quienes no solo son mi pilar, inspiración y motivación, sino que también han cedido momentos valiosos para que pudiera alcanzar este objetivo. A mis directores, Harry y Wilmar, quienes no solo me orientaron en este trabajo, sino que también fueron mentores de vida. A mi amiga y compañera Paola Duque, por su apoyo constante y compañía invaluable. A los pacientes que participaron con entusiasmo y esperanza, recordándome la importancia de este trabajo y su impacto en la vida de quienes más lo necesitan. Al equipo del CIACER, por su invaluable apoyo y acompañamiento en las brigadas. A todos mis amigos y familiares, gracias por estar presentes en cada paso de este recorrido.

## CONTENIDO

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                                  | 1  |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....                                                                                   | 2  |
| JUSTIFICACIÓN.....                                                                                                 | 3  |
| MARCO CONCEPTUAL.....                                                                                              | 5  |
| 1.1. <i>Errores innatos del metabolismo</i> .....                                                                  | 5  |
| 1.2. <i>Enfermedades de depósito lisosomal</i> .....                                                               | 5  |
| 1.3. <i>Generalidades de las mucopolisacaridosis</i> .....                                                         | 6  |
| 1.4. <i>Mucopolisacaridosis tipo IVa o Síndrome de Morquio A</i> .....                                             | 6  |
| 1.4.1. <i>Genética</i> .....                                                                                       | 6  |
| 1.4.2. <i>Presentación clínica de MPS IVA</i> .....                                                                | 8  |
| 1.4.3. <i>Diagnóstico</i> .....                                                                                    | 12 |
| 1.4.4. <i>Tratamiento</i> .....                                                                                    | 15 |
| 1.4.5. <i>Terapia génica</i> .....                                                                                 | 16 |
| 1.5. <i>Genética poblacional</i> .....                                                                             | 17 |
| 1.5.1. <i>Deriva genética y efecto fundador</i> .....                                                              | 17 |
| 1.5.2. <i>Efecto Fundador en Genética Humana</i> .....                                                             | 18 |
| 1.5.3. <i>Selección de alelos recesivos</i> .....                                                                  | 19 |
| 1.5.4. <i>Ancestría global</i> .....                                                                               | 19 |
| 1.6. <i>Detección de variantes fundadoras</i> .....                                                                | 20 |
| 1.6.1. <i>Metodologías para el análisis de haplotipos</i> .....                                                    | 21 |
| 1.6.2. <i>Análisis de haplotipos en síndrome de Morquio</i> .....                                                  | 22 |
| OBJETIVOS .....                                                                                                    | 24 |
| Objetivo general .....                                                                                             | 24 |
| Objetivos específicos.....                                                                                         | 24 |
| CAPÍTULO I: Caracterización clínica y molecular de los pacientes con Mucopolisacaridosis tipo IVA en Colombia..... | 25 |
| 1.1.    METODOLOGÍA.....                                                                                           | 25 |
| Población y muestra.....                                                                                           | 25 |
| Criterios de selección.....                                                                                        | 25 |
| Captación de participantes.....                                                                                    | 25 |
| Caracterización clínica .....                                                                                      | 26 |
| Caracterización molecular.....                                                                                     | 26 |
| 1.2.    RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                               | 28 |
| Población.....                                                                                                     | 28 |

|                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Caracterización clínica .....                                                                          | 28  |
| Caracterización molecular .....                                                                        | 36  |
| CAPÍTULO II: Construcción de haplotipos del gen <i>GALNS</i> en pacientes colombianos con MPS IV ..... | 41  |
| 2.1. METODOLOGÍA.....                                                                                  | 41  |
| Construcción de haplotipos por secuenciación de genoma completo.....                                   | 41  |
| Evaluación de haplotipos reportados en <i>GALNS</i> .....                                              | 45  |
| 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                      | 46  |
| Construcción de haplotipos por secuenciación de genoma completo.....                                   | 46  |
| Evaluación de haplotipos reportados en <i>GALNS</i> .....                                              | 56  |
| CAPÍTULO III: ancestría genética global y local de individuos colombianos con MPS IVA.....             | 60  |
| 3.1. METODOLOGÍA.....                                                                                  | 60  |
| Análisis de ancestría global .....                                                                     | 60  |
| Análisis de ancestría local .....                                                                      | 61  |
| 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                                                      | 63  |
| Análisis de ancestría global .....                                                                     | 63  |
| Análisis de ancestría local .....                                                                      | 72  |
| CONCLUSIONES.....                                                                                      | 77  |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                        | 79  |
| ANEXO 1: CONSENTIMIENTO Y ASENTIMIENTO INFORMADO.....                                                  | 93  |
| ANEXO 2: DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS .....                                                                 | 103 |
| ANEXO 3: DATOS CLÍNICOS.....                                                                           | 104 |
| ANEXO 4: REDES DE HAPLOTIPOS.....                                                                      | 106 |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Mutaciones más frecuentes en el gen GALNS .....                                       | 7  |
| Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con MPS IVA .....                           | 12 |
| Tabla 3. Datos demográficos y moleculares de los pacientes con MPS IVA. ....                   | 36 |
| Tabla 4. Lista de polimorfismos para haplotipos del gen GALNS.....                             | 45 |
| Tabla 5. Comparación de estadísticos del desequilibrio de ligamiento para los haplotipos ..... | 52 |
| Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y pruebas de significancia .....               | 54 |
| Tabla 7. Haplotipos por SNPs intragénicos en GALNS .....                                       | 56 |
| Tabla 8. Valores de F4-ratio con significancia estadística.....                                | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribución geográfica de los participantes por departamento. ....                                           | 29 |
| Figura 2. Comparación de la edad de sospecha y diagnóstico clínico en los participantes<br>.....                        | 30 |
| Figura 3. Frecuencia de los términos HPO en la sospecha clínica de los pacientes.....                                   | 31 |
| Figura 4. Hallazgos clínicos más prevalentes en la población estudiada.....                                             | 34 |
| Figura 5. Distribución alélica de pacientes con MPS IVA.....                                                            | 36 |
| Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa transcrito canónico del gen GALNS.....                                       | 39 |
| Figura 7. Escala Phred por número de secuencias (MultiQC).....                                                          | 47 |
| Figura 8. Cobertura fraccional de los genomas.....                                                                      | 47 |
| Figura 9. Profundidad promedio de variantes por muestra y cromosoma .....                                               | 48 |
| Figura 10. Red de haplotipos de pacientes con MPS IVa .....                                                             | 49 |
| Figura 11. Distribución geográfica de haplotipos de pacientes colombianos con MPS IVA<br>.....                          | 50 |
| Figura 12. Red de haplotipos de pacientes homocigotos para G301C .....                                                  | 51 |
| Figura 13. Redes de haplotipos en poblaciones ancestrales del gen GALNS .....                                           | 51 |
| Figura 14. Distribución de haplotipos más frecuentes del gen GALNS.....                                                 | 58 |
| Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA).....                                                               | 64 |
| Figura 16. Valores del estadístico F3 para $h1=MOR$ y $target=IBS$ .....                                                | 64 |
| Figura 17. Valores del estadístico F3 para $h1=MXL$ y $target=IBS$ .....                                                | 65 |
| Figura 18. Estadístico D para $h1=MOR$ ; $h2=IBS$ y $h4=YRI$ .....                                                      | 66 |
| Figura 19. Estadístico D para $h1=MOR$ ; $h2=YRI$ y $h4=CHB$ .....                                                      | 66 |
| Figura 20. Valores de error de CV para diferentes K .....                                                               | 68 |
| Figura 21. Proporciones de Admixture para $K=2$ .....                                                                   | 69 |
| Figura 22. Proporciones de Admixture para $K=3$ .....                                                                   | 69 |
| Figura 23. Proporciones de Admixture para $K=4$ .....                                                                   | 70 |
| Figura 24. Proporciones de Admixture para $K=5$ .....                                                                   | 71 |
| Figura 25. Frecuencia de haplogrupos mitocondriales.....                                                                | 71 |
| Figura 26. Ancestría local para homocigotos G301C por modelo tricontinental.....                                        | 73 |
| Figura 27. Ancestría local para MOR005 por modelo tricontinental .....                                                  | 74 |
| Figura 28. Ancestría local para heterocigotos compuestos por modelo tricontinental ...                                  | 74 |
| Figura 29. Comparación de ancestría local para homocigotos G301C por modelo<br>tricontinental y cuatritcontinental..... | 76 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AMOVA: Análisis molecular de la varianza (Analysis of Molecular Variance)  
CDX: Chinos Dai en Xishuangbanna (1000 Genomas)  
CEU: Europeos del norte y centro (1000 Genomas)  
CHB: Chinos Han en Beijing (1000 Genomas)  
CLM: Colombianos en Medellín (1000 Genomas)  
ESN: Esan en Nigeria (1000 Genomas)  
GAGs: Glicosaminoglicanos  
GALNS: N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa  
GATK: Genome Analysis Toolkit  
HPO: Human Phenotype Ontology  
IBS: Ibéricos en España (1000 Genomas)  
MPS IVA: Mucopolisacaridosis tipo IVA  
MRCA: Ancestro común más reciente (Most Recent Common Ancestor)  
MXL: Mexicanos en Los Ángeles (1000 Genomas)  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)  
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)  
TRE: Terapia de reemplazo enzimático  
uGAGs: Glicosaminoglicanos urinarios  
VCF: Variant Call Format  
WGS: Secuenciación de Genoma Completo (Whole Genome Sequencing)  
YRI: Yoruba en Ibadan, Nigeria (1000 Genomas)

## RESUMEN

La mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA), también conocida como síndrome de Morquio A, es un trastorno genético autosómico recesivo causado por variantes genéticas patogénicas en el gen *GALNS*. Este gen codifica la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, cuya deficiencia lleva a la acumulación de glicosaminoglicanos, principalmente en cartílagos y huesos, causando anomalías esqueléticas severas y otras manifestaciones clínicas. En Colombia, la mutación p.G301C ha mostrado una frecuencia una frecuencia más alta de lo esperado para esta población, lo que sugiere la posibilidad de un efecto fundador.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la existencia de un efecto fundador para la variante p.G301C en el gen *GALNS* en los pacientes colombianos MPS IVA. Esto se abordó a través de tres objetivos específicos: (1) caracterizar clínica y molecularmente a los pacientes colombianos con MPS IVA; (2) analizar los haplotipos del gen *GALNS* en pacientes y controles para establecer la estructura haplotípica de la variante p.G301C; y (3) estimar la ancestría global y local de estos individuos.

El estudio caracterizó clínica y molecularmente a pacientes colombianos con MPS IVA, encontrando que el 71% de los alelos evaluados correspondieron a la mutación p.G301C, asociada a fenotipos clínicos severos. También se caracterizó el efecto funcional de la mutación intrónica c.121-11G>C y se describió por primera vez la variante p.F216Sfs\*3, ampliando el espectro mutacional del gen *GALNS*. El análisis de haplotipos identificó un bloque conservado de 68.9 Mb asociado a p.G301C, cuya edad se estimó en 1535 años, confirmando un efecto fundador y situando el origen de la mutación en un contexto prehispánico. Por último, el análisis de ancestría global reveló una composición genética mixta, con predominio de ancestría amerindia, reforzando el origen ancestral de la variante.

Este estudio contribuyó significativamente al entendimiento de la distribución y el origen de la mutación p.G301C en el gen *GALNS* en Colombia. Además, este hallazgo sentó las bases para futuros estudios en genética, incluyendo la investigación de variantes asociadas con enfermedades genéticas raras en poblaciones subrepresentadas.

Palabras clave: Mucopolisacaridosis Tipo IVA, Haplotipos, Efecto Fundador, enfermedad rara, marcador genético.

## ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis type IVA (MPS IVA), also known as Morquio A syndrome, is an autosomal recessive genetic disorder caused by pathogenic variants in the GALNS gene. This gene encodes the enzyme N-acetylgalactosamine-6-sulfatase, whose deficiency leads to the accumulation of glycosaminoglycans, primarily in cartilage and bones, resulting in severe skeletal abnormalities and other clinical manifestations. In Colombia, the p.G301C mutation has shown a high frequency, suggesting a possible founder effect.

The aim of this study was to evaluate the existence of a founder effect for the p.G301C variant in Colombian MPS IVA patients. This was addressed through three specific objectives: (1) to clinically and molecularly characterize Colombian patients with MPS IVA; (2) to analyze the haplotypes of the GALNS gene in patients and controls to establish the haplotypic structure of the p.G301C variant; and (3) to estimate the global and local ancestry of these individuals.

The study clinically and molecularly characterized Colombian patients with MPS IVA, finding that 71% of the alleles evaluated corresponded to the p.G301C mutation, which was associated with severe clinical phenotypes. The functional impact of the intronic mutation c.121-11G>C was also characterized, and the novel p.F216Sfs\*3 variant was described for the first time, expanding the mutational spectrum of the GALNS gene. Haplotype analysis identified a conserved 68.9 Mb block associated with p.G301C, whose age was estimated at 1535 years, confirming a founder effect and placing the mutation's origin in a pre-Columbian context. Finally, global ancestry analysis revealed a mixed genetic composition in the patients, with a predominance of Amerindian ancestry, further supporting the ancestral origin of the variant.

This study significantly contributed to understanding the distribution and origin of the p.G301C mutation in Colombia. Moreover, it established a framework for future population genetics studies, providing a solid basis for characterizing variants associated with rare genetic diseases in underrepresented populations.

**Keywords:** Mucopolysaccharidosis Type IVA, Haplotypes, Founder Effect, rare disease, genetic marker.

## INTRODUCCIÓN

La mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) o síndrome de Morquio A, es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *GALNS*, que codifica la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa. Las mutaciones en este gen resultan en una actividad reducida o nula de dicha enzima, lo que provoca la acumulación de glicosaminoglicanos (GAGs) no degradados en los lisosomas. Esta acumulación progresiva genera displasia esquelética, rigidez articular y otras complicaciones que pueden variar de acuerdo con el fenotipo de los pacientes.

Aunque la MPS IVA es una enfermedad rara a nivel mundial, en Colombia se ha identificado como una de las formas más frecuentes de mucopolisacaridosis. A pesar de su prevalencia, la información disponible sobre las características clínicas y genéticas de los pacientes es limitada. Algunos estudios han señalado una alta frecuencia de la mutación p.G301C en el gen *GALNS* en la población colombiana, pero no está claro si esta alta frecuencia podría estar relacionada con un efecto fundador. Este fenómeno ocurre cuando una mutación específica se concentra en una población debido a un origen común, como se ha observado en otras enfermedades raras en poblaciones cerradas o con altos niveles de consanguinidad. Lo anterior, subraya la necesidad de realizar investigaciones que evalúen si la mutación p.G301C en los pacientes colombianos con MPS IVA está vinculada a un efecto fundador.

Este proyecto de investigación tuvo como objetivo determinar si la alta frecuencia de la variante patogénica p.G301C en el gen *GALNS* en pacientes colombianos con MPS IVA estaba relacionada con un efecto fundador y un ancestro común. Para ello, se analizaron las características clínicas y moleculares de los pacientes, los haplotipos asociados a la mutación y la ancestría genética, tanto local como global, de los afectados. Este enfoque permitió, no solo aportar al conocimiento del impacto genético de esta variante en la población colombiana, sino también sentar las bases para optimizar el asesoramiento genético y mejorar el pronóstico, diagnóstico y manejo clínico de los pacientes y sus familias.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos estudios realizados en Colombia sitúan la mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) como la MPS más frecuente en diferentes departamentos del país. A pesar de lo anterior, la información disponible sobre las características clínicas y espectro mutacional de los pacientes es limitada (1,2). Los pocos estudios que describen el espectro mutacional de los pacientes con MPS IVA en Colombia sugieren una mayor prevalencia de la mutación G301C en las cohortes analizadas (3,4). Por lo tanto, surge un interrogante: ¿Esta alta prevalencia de la mutación G301C en el gen *GALNS* está influenciada por un efecto fundador en la población colombiana? Para abordar este problema y contribuir al entendimiento de la enfermedad en este contexto, se propone llevar a cabo una investigación integral que no solo analice la presencia de esta mutación, sino que también indague sobre la ascendencia genética de los pacientes. Esto permitirá comprender de manera más profunda el impacto clínico y genético en la población afectada, contribuyendo así a mejorar el pronóstico de la enfermedad y a brindar un asesoramiento genético más personalizado a los pacientes y sus familias.

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un grupo de más de 50 desordenes metabólicos heredables, caracterizados por la acumulación intralisosomal de sustratos no degradados. EDL son tradicionalmente clasificados según las propiedades químicas del sustrato acumulado. Individualmente, cada uno de estos desórdenes son raros; sin embargo, su prevalencia acumulada es relativamente alta cuando se compara con otros grupos de enfermedades raras. Su prevalencia mundial se estima en 1 por cada 8.000 nacidos vivos (1,2).

Dentro de este grupo se incluyen las mucopolisacaridosis (MPS), un grupo de patologías de origen genético, causadas por el déficit en la actividad específica de una enzima lisosomal requerida para el catabolismo de glicosaminoglicanos (GAG). Bioquímicamente se caracterizan por la acumulación parcial de GAG degradados dentro de los lisosomas y elevación de cristales de GAG en orina, sangre y líquido cefalorraquídeo. La acumulación de GAG causa daño progresivo en una gran variedad de tejidos, manifestándose clínicamente como rigidez articular, malformaciones óseas, retardo del crecimiento, déficit pulmonar, anomalías hepáticas, oculares, cardíacas, dentales y en algunos casos neurológicas (3–6).

La mayoría de los pacientes con MPS IVA generalmente se ven saludables en el período neonatal. De hecho, según el Registro Internacional de Morquio A, menos del 50% de los pacientes se diagnostican antes de los 5 años de edad (7) y generalmente el diagnóstico se realiza cuando se hacen evidentes los primeros signos de displasia esquelética, la característica más crítica de estos pacientes (7,8). El tiempo que transcurre entre el nacimiento y el diagnóstico es un factor determinante para el pronóstico, ya que la displasia esquelética es progresiva y la terapia de reemplazo enzimático, el único tratamiento disponible actualmente, no ha demostrado resolver las lesiones óseas preexistentes (9,10). En este sentido, el reconocimiento de las características clínicas combinado con el uso de pruebas radiográficas, genéticas y bioquímicas, es esencial para mejorar las tasas de diagnóstico temprano y el pronóstico de los pacientes con MPS IVA.

La caracterización mutacional del gen *GALNS*, a través del análisis molecular de los pacientes con MPS IVA permite confirmar el diagnóstico y direcciona la consejería genética en las familias afectadas (11). Dado que esta patología presenta un patrón de herencia autosómico recesivo, la mayoría de los pacientes evaluados son homocigotos para una mutación, seguido por heterocigotos compuestos. Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de pacientes en los que sólo se detecta una alteración en el gen *GALNS*, lo que representa un desafío para la interpretación de las pruebas moleculares, el pronóstico de los pacientes y la consejería genética familiar (12). Reconocer los genotipos

más prevalentes en nuestro país permitirá mejorar el abordaje diagnóstico y el acceso a los servicios de salud, ya que se podrán optimizar y ampliar las pruebas de tamizaje genético. Adicionalmente, esta información contribuirá al esclarecimiento de la relación genotipo-fenotipo y sentará las bases moleculares para la formulación de la terapia génica.

El espectro mutacional de la MPS IVA es amplio, ya que las alteraciones en el gen *GALNS* son numerosas y heterogéneas; actualmente se conocen cerca de 300 mutaciones asociadas con MPS IVA. Sin embargo, en Colombia se ha reportado una prevalencia aumentada de la mutación G301C (13,14), una mutación recurrente donde ocurre un cambio en el aminoácido Glicina por Cisteína en la posición 301 de la proteína. Lo anterior puede estar relacionado con un efecto fundador, cuando esta variante estuvo presente en un pequeño número de individuos que iniciaron la población (12), tal como se cómo se ha reportado para otras patologías de baja prevalencia mundial que son más frecuentes en ciertos grupos étnicos o poblaciones con una mayor tasa de consanguinidad (15–17). El conocimiento de la estructura genética de la población con MPS IVA en Colombia, a través de la caracterización por haplotipos del gen *GALNS* y el análisis de ancestría global, permitirá establecer si existe un efecto fundador de la mutación G301C. Esto contribuirá a mejorar la predicción del riesgo en regiones específicas, orientar políticas públicas para la prevención y la distribución eficiente de recursos en salud, y promover el desarrollo de futuros estudios en genética médica poblacional.

Es por lo anterior que esta investigación es fundamental, ya que no solo ofrece una comprensión más profunda de las bases genéticas del síndrome de Morquio IVA en una población específica, sino que también permitirá la personalización de tratamientos y la identificación de factores de riesgo específicos. Además, contribuirá al conocimiento sobre la variabilidad genética en contextos étnicos y geográficos particulares, promoviendo así avances hacia una atención médica más precisa y adaptada a la diversidad genética.

## MARCO CONCEPTUAL

### **1.1. Errores innatos del metabolismo**

El metabolismo puede definirse como el conjunto de vías metabólicas complejas que se realizan dentro de un organismo para que este pueda obtener energía a partir de biomoléculas como lípidos, carbohidratos y proteínas (18). Cada una de estas rutas metabólicas requiere enzimas y sustratos específicos para garantizar su funcionamiento y la obtención de los productos energéticos esperados.

Los errores innatos del metabolismo (IEM), también conocidos como enfermedades metabólicas hereditarias, son un grupo heterogéneo de trastornos monogénicos que se producen por la actividad deficiente de una sola enzima en una vía metabólica (19) y resultan en enfermedades a causa de: i) acumulación de un sustrato tóxico, ii) deficiencia de un producto y iii) desviación del sustrato a una vía metabólica alternativa (20). A pesar de que estos trastornos son considerados enfermedades raras o de baja prevalencia, si se estudian en conjunto, su prevalencia general puede ser mayor a 1 en 1000 nacidos vivos (21,22). Se estima que la prevalencia global de nacimientos de IEM, por todas las causas, es de 51 por 100.000 nacidos vivos (23).

Los IEM se pueden clasificar de varias maneras, como enfermedades de moléculas pequeñas como aminoacidopatías, trastornos del ciclo de la urea, acidemias orgánicas, trastornos de oxidación de ácidos grasos, trastornos de purinas y pirimidinas y trastornos del metabolismo de los metales; y enfermedades de moléculas grandes como trastornos de depósito lisosomal, trastornos de almacenamiento de glucógeno, trastornos peroxisomales y trastornos congénitos de glucosilación (20).

### **1.2. Enfermedades de depósito lisosomal**

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un grupo de más de 50 desordenes metabólicos heredables, caracterizados por la acumulación de sustratos no degradados dentro de los lisosomas. Estas organelas celulares contienen enzimas responsables de la degradación de varios compuestos que incluyen mucopolisacáridos, esfingolípidos y glucoproteínas. Cuando la actividad de alguna de estas enzimas es deficiente, se acumula progresivamente material parcialmente degradado, lo que conlleva a la interrupción de la función celular (24).

Las EDL son tradicionalmente clasificadas según las propiedades químicas del sustrato acumulado. Individualmente, cada uno de estos desórdenes son raros; sin embargo, su

prevalencia acumulada es relativamente alta cuando se compara con otros grupos de enfermedades raras. Su prevalencia se estima en 1 por cada 8.000 nacidos vivos (2,25).

### **1.3. Generalidades de las mucopolisacaridosis**

Dentro del grupo de las EDL se incluyen las mucopolisacaridosis (MPS), un grupo de patologías de origen genético, causadas por el déficit en la actividad específica de una enzima lisosomal requerida para el catabolismo de glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son una familia de polisacáridos lineales complejos, altamente sulfatados, que se clasifican, de acuerdo a las unidades repetidas de los disacáridos que los conforman, en heparán sulfato, condroitín sulfato, keratán sulfato e hialuronato (26).

Las MPS se caracterizan bioquímicamente por la acumulación parcial de GAG no degradados dentro de los lisosomas, y elevación de cristales de GAG en orina, sangre y líquido cefalorraquídeo. La acumulación de GAG causa daño progresivo en una gran variedad de tejidos, manifestándose clínicamente como rigidez articular, malformaciones óseas, retardo del crecimiento, déficit pulmonar, anomalías hepáticas, oculares, cardíacas, dentales y en algunos casos neurológicas (ver tabla 1) (3,27,28).

Las MPS pueden dividirse en ocho categorías (MPS I, II, III, IV, VI, VII, IX, X), que pueden adicionalmente ser subdivididas dependiendo del GAG acumulado, la enzima afectada y la severidad del fenotipo (3,28). Las MPS son heredadas con un patrón de herencia autosómica recesiva, y afecta hombres y mujeres por igual; excepto MPS II que es ligada al X recesiva y afecta principalmente a hombres, sin embargo, casos raros de pacientes de género femenino han sido reportados (29,30).

### **1.4. Mucopolisacaridosis tipo IVa o Síndrome de Morquio A**

La MPS tipo IV, conocida como síndrome de Morquio, se presenta bajo dos formas: MPS IV A y IV B, en las cuales están alteradas las enzimas N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) y  $\beta$ -galactosidasa (GLB1) respectivamente. Debido a la alta prevalencia de MPS tipo IV A en Colombia, así como a la baja prevalencia de MPS tipo IV B en el mundo, el presente trabajo se enfocará en la MPS tipo IV A o Síndrome de Morquio tipo A. La enzima GALNS hidroliza específicamente los enlaces éster de sulfato del monosacárido N-acetilgalactosamina-6-sulfato presente en el condroitín sulfato, al igual que para el monosacárido galactosa-6-sulfato, compuesto del keratán sulfato (2).

#### **1.4.1. Genética**

El gen *GALNS* codifica para la enzima del mismo nombre. Este gen tiene un tamaño de 43,2kb y su locus es 16q24.3 que corresponde a la región genómica Ch16: 88.813.734-

88.856.970. El gen *GALNS* está compuesto por 14 exones que se transcribe en un RNA mensajero (mRNA) de 1566 nucleótidos y finalmente traduce una proteína de 522 aminoácidos (31).

Hasta ahora se han identificado cerca de 300 mutaciones generalmente de sentido erróneo, las cuales varían dependiendo de la población analizada, ya que algunos alelos son mucho más frecuentes en ciertas regiones o subpoblaciones de grupos étnicos (Tabla 1), posiblemente debido a los efectos fundadores en los que una o más alteraciones del gen *GALNS* estuvieron presentes en poblaciones iniciadas por un pequeño número de individuos con alta tasa endogámica (3).

Tabla 1. Mutaciones más frecuentes en el gen *GALNS*

| Lugar geográfico                                                         | Mutaciones más frecuentes                                                                                             | Frecuencia alélica                                         | Referencia |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| China (n=16)                                                             | p.G340D<br>p.A107T<br>p.F452L<br>p.H236D<br>p.L36_L37del<br>p.N289S<br>p.Q422X<br>p.S82L<br>p.W325X<br>Sin determinar | 17%<br>4%<br>4%<br>4%<br>4%<br>4%<br>4%<br>4%<br>4%<br>12% | (32)       |
| Colombia (n=32)                                                          | p.G301C<br>p.R386C<br>p.S162F<br>Sin determinar                                                                       | 50%<br>16%<br>12%<br>3%                                    | (14)       |
| Malasia (n=17)                                                           | p.L36_L37del<br>p.M318R<br>p.F216S<br>Sin determinar                                                                  | 12%<br>12%<br>9%<br>12%                                    | (33)       |
| Portugal, California, Estados Unidos, Arabia Saudita y Australia (n=163) | p.I113F<br>p.G301C<br>p.G116V<br>p.A291T<br>p.R386C<br>p.S287L<br>p.T312S<br>Sin determinar                           | 9%<br>5%<br>4%<br>4%<br>4%<br>3%<br>3%<br>3%               | (34)       |

El cuadro clínico depende en gran medida de la localización de la mutación, es decir, si la mutación altera la estructura terciaria de la enzima o el sitio activo de ésta, dando un caso más severo que aquellas mutaciones periféricas que no afectan la estructura, el plegamiento, ni el sitio de acción (27). Adicionalmente, se han establecido algunas relaciones fenotipo-genotipo de acuerdo con el tipo de mutación, así, las mutaciones puntuales han sido más relacionadas con fenotipos atenuados, mientras que las grandes deleciones, mutaciones sin sentido y mutaciones que afectan el sitio de corte y empalme, han sido relacionadas con fenotipos más severos (35,36)

El keratán sulfato es un componente fundamental en la estructura de la matriz extracelular y se une al condroitín sulfato para la conformación de estructuras óseas y cartilaginosas; Además, es el principal constituyente de la córnea. Por otro lado, el condroitín sulfato se encuentra principalmente en huesos, cartílago y válvulas cardíacas (37). Debido a estas características, las personas con mucopolisacaridosis tipo IVA experimentan un compromiso severo en los sistemas osteomuscular y ocular. (38).

Los pacientes con MPS IVA generalmente presentan problemas musculoesqueléticos que tienen manifestaciones secundarias que producen alteraciones en articulaciones, sistema cardiorrespiratorio, sistema nervioso central y periférico en médula espinal y mielopatía por compresión (6,39). Estas alteraciones con frecuencia ocasionan limitación en la movilidad y deterioran la calidad de vida de los afectados (39).

#### **1.4.2. Presentación clínica de MPS IVA**

La mucopolisacaridosis tipo IVA (MPS IVA) comprende un espectro clínico que incluye una forma rápidamente progresiva y otra lentamente progresiva. La mayoría de los recién nacidos (RN) con mutaciones en el gen *GALNS* en homocigosis o heterocigosis compuesta no presentan hallazgos clínicos distintivos hasta el primer año de vida, por lo que incluso la forma severa generalmente se detecta entre el primer y el tercer año de vida. La forma lentamente progresiva se hace evidente en la infancia tardía o la adolescencia (7).

Las primeras manifestaciones clínicas son variables. En la forma rápidamente progresiva, las más comunes son la cifoescoliosis, *el genu valgum* y *el pectus carinatum*. En cambio, en la forma lentamente progresiva, los síntomas iniciales suelen incluir dolor y rigidez en la cadera (7).

Algunas características sugestivas de la MPS IVA, que son raras con respecto de las otras mucopolisacaridosis, son la capacidad intelectual normal, la laxitud ligamentosa y la hiper movilidad articular (excepto en codos, cadera y rodillas). Los dismorfismos faciales o facies gruesas también pueden estar presentes, pero se han reportado como atenuados con respecto a la presentación en otros trastornos (10).

##### **1.4.2.1. Alteraciones musculoesqueléticas**

Las afectaciones musculoesqueléticas tienden a agravarse con el paso de los años y la acumulación progresiva del KS y el CS en los tejidos. Por ejemplo, en extremidades inferiores se puede presentar una desalineación de la columna lumbar caracterizada por cifosis toracolumbar, como consecuencia de la subluxación progresiva de la cadera y/o la

deformidad del valgo. Sin embargo, si no se trata a tiempo, puede producir dolor de cadera y rodilla, conduciendo a una alteración significativa de la marcha y disminución de la resistencia (40). Adicionalmente, la cifosis toracolumbar puede provocar complicaciones como la estenosis espinal focal, mielopatía compresiva y paraplejia, en pacientes entre la segunda y tercera década de la vida (41,42).

La rodilla y el tobillo valgo son las anomalías más comunes de las extremidades inferiores en pacientes con MPS IVA. El *genu valgum* es el resultado de la afectación femoral distal y tibial proximal y la laxitud articular. La limitación de la movilidad articular generalmente conduce a la pérdida de deambulación durante la segunda década de la vida (43).

Otro hallazgo característico de pacientes con MPS IVA es la displasia de cadera, presentándose hasta en el 75% de los afectados (6). Este hallazgo puede aparecer entre la primer y segunda década de la vida y se pueden observar epífisis femorales pequeñas con acetábulos poco profundos. Sin embargo, con el curso de la enfermedad, aparecen cambios destructivos en la cabeza femoral y los acetábulos, provocando dislocación de la cadera, artritis y restricción articular (8).

En extremidades superiores se puede observar en la muñeca hipermovilidad en extensión y flexión, así como desviación cubital, lo que disminuye la fuerza de agarre de la mano, característico de los pacientes con MPS IVA. Este hallazgo podría deberse puramente a las anomalías esqueléticas o a la combinación de laxitud ligamentosa y el desplazamiento del tendón, ya sea primario o secundario. Además, la debilidad muscular progresiva también puede contribuir a la pérdida de fuerza (44).

Los pacientes con MPS IVA pueden presentar compresión de la medula espinal en cualquier segmento, siendo más común en el segmento cervical. Esta compresión puede ser el resultado de varios factores, entre ellos, la inestabilidad cervical, hipoplasia odontoidea, hiperlaxitud ligamentosa, hipertrofia cartilaginosa en la articulación atlantoaxial, el depósito de GAG en el espacio extradural, protrusión discal, cifosis toracolumbar y estenosis del canal (8,42).

Las articulaciones hipermóviles resultantes de la hiperlaxitud ligamentosa son un hallazgo característico de los pacientes con MPS IVA. Sin embargo, se ha reportado una disminución de la movilidad en articulaciones como las rodillas, caderas y codos (45).

#### 1.4.2.2. Alteraciones cardíacas

Los pacientes con MPS IVA acumulan GAG en las válvulas cardíacas, siendo más frecuente y severo el compromiso de la válvula mitral (VM). En estos pacientes la VM tiene los

bordes engrosados y enrollados, con cuerdas gruesas y acortadas, lo que puede conducir a regurgitación y estenosis valvulares (39). Adicionalmente, se ha observado hipertrofia ventricular y esclerosis intimal de las arterias coronarias (46). La insuficiencia mitral, la insuficiencia aórtica y la insuficiencia pulmonar son hallazgos menos comunes en pacientes con MPS IVA (39). También se ha descrito que los pacientes con MPS IVA presentan una frecuencia cardíaca anormalmente alta y un índice de miocardio alto para compensar el diámetro ventricular izquierdo pequeño y el bajo volumen sistólico (6)

#### *1.4.2.3. Alteraciones respiratorias*

La etiología de las alteraciones respiratorias en pacientes con MPS IVA es multifactorial. Se produce por la acumulación de GAG en tejidos respiratorios y óseos, la obstrucción de las vías respiratorias superiores e inferiores, la mielopatía cervical y la restricción de la pared torácica. Las complicaciones respiratorias son una causa importante de morbilidad en estos pacientes (46).

La obstrucción de las vías respiratorias se atribuye a la acumulación de GAG en adenoides, amígdalas, laringe, tráquea y árbol bronquial, lo que resulta en anomalías como hipertrofia adenotonsilar, distorsión traqueal, traqueobroncomalacia y apnea obstructiva del sueño (47).

Las deformidades de la pared torácica, que incluyen el *pectus carinatum* y la cifoscoliosis, pueden limitar la expansión pulmonar y producir un deterioro restrictivo por la reducción del volumen pulmonar. La baja estatura y la hepatomegalia pueden producir un desplazamiento ascendente del diafragma provocando una disminución de la función respiratoria. La inestabilidad atlantoaxial y la compresión de la médula espinal pueden provocar disfunción del nervio frénico y debilidad muscular inspiratoria. Estas alteraciones, en conjunto, producen enfermedad pulmonar restrictiva en pacientes con MPS IVA, que de no ser tratada pueden producir insuficiencia respiratoria e incluso la muerte (42,48).

En un estudio realizado con 28 pacientes con Morquio A ( $12 \pm 8,14$  años) se evidenció que el 68% de los pacientes tenían al menos un 25% de estrechamiento traqueal y que el estrechamiento empeoraba con la edad (todos los pacientes mayores de 15 años tenían más de 50% de estrechamiento). El 28% de los pacientes presentaron estrechamiento traqueal severo ( $>75\%$ ). La evidencia de tal estrechamiento traqueal fue evidente desde los 2 años de edad (49).

Por lo anterior, los pacientes con MPS IVA tienen un mayor riesgo de complicaciones que incluyen infecciones recurrentes, pérdida progresiva de la función respiratoria, trastornos

respiratorios del sueño, desde la primera década de la vida y, en última instancia, insuficiencia respiratoria (7,8).

#### *1.4.2.4. Alteraciones oculares*

La opacidad corneal (OC) es lentamente progresiva y es el hallazgo ocular más común en pacientes con MPS IVA. La OC se debe principalmente a inclusiones de GAG que se unen a la membrana de los queratocitos, por lo que, a mayor edad del paciente, existe una mayor acumulación de GAG y por tanto mayor gravedad de la OC, lo que puede resultar en la reducción significativa de la agudeza visual (50). Aunque se puede realizar queratoplastia, el éxito de este procedimiento está limitado por la reopacificación de la córnea y la discapacidad visual debida a la degeneración retiniana y a la atrofia óptica (51)

El glaucoma es un hallazgo también reportado en pacientes con MPS IVA. Se han descrito pocos casos de glaucoma de ángulo abierto, probablemente debido a la acumulación de GAG en la malla trabecular sobre el tiempo, obstruyendo el flujo de salida del humor acuoso (48).

Los pacientes con MPS IVA pueden presentar otras anomalías ópticas, tales como, astigmatismo, cataratas, miopía, hipermetropía y en raras ocasiones atrofia del nervio óptico o distrofia retiniana (48,50).

#### *1.4.2.5. Alteraciones dentales y auditivas*

La pérdida auditiva leve a moderada es común en pacientes con MPS IVA. Esta pérdida puede ser conductiva, neurosensorial o mixta. Sin embargo, en estos pacientes es frecuente la forma mixta, atribuida a la combinación de un elemento conductor y un elemento neurosensorial, de evolución lentamente progresiva. La pérdida auditiva conductiva puede ser secundaria a las infecciones recurrentes del tracto respiratorio superior, la otitis media serosa y la deformidad de los huesecillos del oído. Mientras tanto, la forma neurosensorial se atribuye principalmente a la acumulación de GAG en el sistema auditivo que incluye oído medio, coclear, octavo nervio y tronco encefálico inferior (48).

Las anomalías dentales de los pacientes con MPS IVA incluyen dientes posteriores cónicos con copas puntiagudas y dientes anteriores maxilares separados y ensanchados. La articulación temporomandibular se ve afectada por una reabsorción severa de la cabeza del cóndilo y el esmalte dental suele ser delgado, hasta el 25% del grosor normal (5).

#### *1.4.2.6. Alteraciones neurológicas*

Los pacientes con MPS IV generalmente tienen hitos de desarrollo normales, así como un coeficiente intelectual normal. Sin embargo, pueden presentarse hallazgos neurológicos secundarios a anomalías de la médula espinal presentes en las regiones cervical y/o lumbar que pueden generar retraso del desarrollo y problemas de aprendizaje (7).

Adicionalmente, Davison et al., en el 2013 reportaron trastornos neuropsiquiátricos en pacientes con MPS IVA. Ellos realizaron una evaluación neurocognitiva en 14 pacientes, entre los 5 y 17 años y encontraron ansiedad, depresión, disminución de la capacidad de atención y quejas somáticas. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si estos hallazgos son causados por anormalidades bioquímicas específicas de la enfermedad o por las limitaciones producidas por el fenotipo de los afectados (52).

### **1.4.3. Diagnóstico**

El diagnóstico de MPS IVA inicia con la sospecha clínica en pacientes con fenotipo osteomuscular clásico, dependiendo de la severidad y la edad de presentación. El diagnóstico de MPS IVA se confirma con la cuantificación bioquímica de la actividad enzimática de GALNS en leucocitos o fibroblastos cultivados, la cual resulta baja o ausente; y/o a través de pruebas moleculares del gen *GALNS* para identificar variantes patogénicas bialélicas (10,48).

#### **1.4.3.1. Clínico**

El diagnóstico clínico de MPS IVA debe sospecharse en un individuo con los hallazgos descritos en la tabla 3, la cual describe antecedentes médicos, examen físico, radiografías esqueléticas y examen oftalmológico.

*Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con MPS IVA*

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antecedentes médicos | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin hallazgos clínicos distintivos al nacer</li> <li>• Antecedentes de adenoidectomía, amigdalectomía, reparación de hernia, tubos de ventilación auditiva (hallazgos generales para todos los trastornos MPS)</li> <li>• Antecedentes de descompresión medular y/o fusión de la columna cervical o antecedentes de cirugía para alineamientos de extremidades (exclusivo de MPS IVA entre todos los trastornos de MPS)</li> <li>• Compromiso respiratorio (apnea del sueño, limitaciones de resistencia, ronquidos)</li> <li>• Anomalías de la válvula cardíaca</li> <li>• Anomalías dentales</li> </ul> |
| Examen físico        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estatura baja marcada con tronco corto y extremidades normales (el brazo excede la altura)</li> <li>• Cuello corto</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Facies toscas</li> <li>• Hernias</li> <li>• Desviación cubital de las muñecas</li> <li>• Pectus carinatum</li> <li>• Tórax en tonel</li> <li>• Cifosis toracolumbar y escoliosis</li> <li>• Genu valgum (golpe de rodilla)</li> <li>• Articulaciones hipermóviles</li> <li>• Contracturas articulares</li> <li>• Hiperplasia de amígdalas</li> <li>• Caminata con pausas frecuentes</li> <li>• Escoliosis y cifosis</li> <li>• Hepatomegalia y/o esplenomegalia</li> <li>• Opacidad corneal</li> </ul> |
| Hallazgos imágenes diagnósticas | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipoplasia odontoidea con inestabilidad cervical posterior</li> <li>• Cifosis</li> <li>• Escoliosis</li> <li>• Pectus carinatum</li> <li>• Ulnas cortas, desviación cubital de la epífisis radial y maduración ósea retrasada</li> <li>• Metacarpianos cortos con los extremos proximales del segundo al quinto metacarpianos redondeados o puntiagudos</li> <li>• Alas ilíacas ensanchadas, aplanamiento de epífisis femorales y coxa valga</li> </ul>                                                |
| Otros                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Examen oftalmológico: discapacidad visual secundaria a opacidad corneal, astigmatismo y/o retinopatía.</li> <li>• Examen auditivo: pérdida de la audición neurosensorial y/o conductiva.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

#### 1.4.3.2. Bioquímico

Después de establecer una sospecha clínica de MPS IVA, se pueden usar varias pruebas de laboratorio para llegar a un diagnóstico. La detección se puede realizar ya sea mediante la medición de la elevación anormal de los niveles de GAG en orina o midiendo la actividad enzimática.

##### a. Detección urinaria de GAG

Esta prueba se basa en la excreción urinaria del exceso de GAG (uGAG) que se produce en las MPS. Es importante tener en cuenta que la excreción urinaria de GAG, expresada en miligramos de GAG por gramo de creatinina, es normalmente alta en recién nacidos y niños hasta los dos años de edad, entre 20 y 50 mgGAG/mmol de creatinina. Sin embargo, este valor disminuye con la edad, se estabiliza en la segunda década de la vida, y permanece constante durante la edad adulta. Es notable que los uGAG pueden ser extremadamente altos en orina de recién nacidos normales y, por lo tanto, no deben considerarse una prueba de detección confiable en este grupo de edad (11).

En el caso de MPS IVA, se debe determinar la cantidad total de uGAG y diferenciar los tipos específicos de GAG, para evitar resultados falsos negativos ya que el KS puede estar presente sin elevar la cantidad total de GAG por encima de los límites superiores para individuos no afectados (11).

b. Análisis de actividad enzimática

El diagnóstico de MPS IVA requiere la demostración de una deficiencia en la actividad de la enzima GALNS, por lo que, a partir de células del paciente como fibroblastos o leucocitos se llevan a cabo ensayos *in vitro* que permiten determinar si en dichas células los sustratos son convertidos eficientemente en productos por la enzima GALNS. Esta enzima actúa sobre dos sustratos, N-acetilgalactosamina-6-sulfato y galactosa-6-sulfato, por lo tanto, ambos sustratos se utilizan en las pruebas bioquímicas para cuantificar la actividad de la enzima GALNS *in vitro* (53).

La realización de análisis de la actividad enzimática para MPS IVA se debe hacer en conjunto con la evaluación de otras enzimas para descartar diagnósticos diferenciales en pacientes con fenotipos superpuestos. Entre las enzimas a evaluar se debe incluir una sulfatasa, como la arilsulfatasa B (EC 3.1.6.12) o la iduronato-2-sulfatasa (EC 3.1.6.13), para descartar una deficiencia de sulfatasa múltiple (MSD). También la evaluación de  $\beta$ -galactosidasa es útil, ya que permite descartar MPS IVB la cual puede causar KS urinario elevado (11).

1.4.3.3. Molecular

El análisis molecular se utiliza para identificar mutaciones genéticas que provocan una actividad enzimática GALNS disminuida o ausente. Debido a que MPS IVA es una enfermedad autosómica recesiva, ambos alelos *GALNS* deben contener una mutación patogénica para que un paciente resulte afectado (11,35).

El análisis molecular se realiza a través de la secuenciación del gen *GALNS*. Generalmente, se toma una muestra de sangre o fluido oral, de donde se obtiene el ADN a partir de los leucocitos o células epiteliales, respectivamente, a través del cual se realiza la amplificación de las regiones de interés y posteriormente la secuenciación de las regiones codificantes del gen *GALNS*, así como pequeños segmentos de regiones intrónicas inmediatamente adyacentes (11). También se puede utilizar tecnologías de Next Generation Sequencing (NGS), que permite obtener la secuencia completa del gen.

Si bien los métodos basados en la secuenciación del ADN identifican mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio de sentido y pequeñas inserciones y deleciones en la región codificante del gen, estas tecnologías no son capaces de identificar cambios en el

número de copias, por lo que se requiere usar métodos adicionales para identificar estas variantes (54). Otra limitación, incluso cuando se utilizan ambas tecnologías, es que las mutaciones de las regiones promotoras no son detectables y la evaluación de su patogenicidad continúa siendo un desafío (35).

#### **1.4.4. Tratamiento**

El tratamiento de las manifestaciones secundarias en las personas con MPS IVA se realiza con terapias de apoyo, de acuerdo con las manifestaciones clínicas de cada paciente. Sin embargo, generalmente se requiere una intervención multidisciplinaria que incluye fisiatras para la rehabilitación física, fisioterapeutas para mejorar la movilidad, terapeuta ocupacional para optimizar la autonomía, psicólogo para abordar habilidades de afrontamiento, terapia familiar y calidad de vida, entre otros. (6,27)

Para las manifestaciones de tipo musculoesquelético se recomienda mantener un nivel adecuado de actividad física que debe ser monitoreado por especialistas para prevenir lesiones adicionales en las articulaciones (55). La mayoría de las manifestaciones óseas requieren corrección quirúrgica, por ejemplo, la mala alineación del tobillo a menudo se corrige mediante una osteotomía tibial distal, la modulación del crecimiento se logra mediante el anclaje quirúrgico temporal de la placa de crecimiento y la cirugía en displasia de cadera puede controlar el dolor y mejorar la alineación. Sin embargo, también se pueden considerar intervenciones no quirúrgicas, por ejemplo, para estabilizar el rango de movimiento de la muñeca, a través del uso de férulas externas (8,40,55).

Generalmente se utilizan fármacos betabloqueantes para tratar la taquicardia que se presenta como mecanismo compensatorio del bajo volumen sistólico y diámetro del ventrículo izquierdo. Si se presentan complicaciones valvulares, tipo insuficiencia mitral, se debe considerar el reemplazo valvular (6).

La extirpación quirúrgica de las amígdalas y adenoides agrandadas mejora la obstrucción de las vías aéreas superiores y la apnea obstructiva del sueño. Sin embargo, en personas con estrechamiento difuso de la vía aérea que no mejora con la adenotonsilectomía, se puede considerar la aplicación de presión positiva continua de la vía aérea y la traqueotomía (7). Si se presenta obstrucción de vías aéreas inferiores se debe usar broncodilatadores y, en algunos casos, corticosteroides (7).

La opacidad corneal a menudo requiere queratoplastia penetrante. Sin embargo, el resultado puede variar, ya que se ha informado su recurrencia durante el primer año posterior al procedimiento quirúrgico (56).

Se recomienda la colocación del tubo de ventilación para mejorar la audición a largo plazo. Además, el uso de audífonos mejora la discapacidad auditiva progresiva en los pacientes con MPS IVA (6).

#### *1.4.4.1. Terapia de reemplazo enzimático (ERT)*

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA) aprobó, en el 2014, el uso de GALNS recombinante en humanos (elosulfase alfa, Vimizim<sup>®</sup>) como ERT para pacientes con MPS IVA y se convirtió en una de las opciones terapéuticas más importantes debido a sus múltiples ventajas, entre ellas un bajo riesgo de mortalidad (57). Sin embargo, la ERT presenta varias limitaciones, entre las cuales, la más importante es quizá el limitado efecto que tiene sobre la displasia esquelética, un problema crítico para los pacientes con MPS IVA, ya que la perfusión relativamente reducida del sistema esquelético limita la cantidad de enzima que llega a estos tejidos. Estudios realizados en ratones con la enzima GALNS modificada, dirigida específicamente a hueso, demostraron que esta orientación de la enzima mejora las manifestaciones clínicas y las lesiones óseas patológicas en el modelo utilizado. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para evaluar el efecto terapéutico de estas nuevas moléculas (57,58).

#### *1.4.4.2. Terapia con células madre hematopoyéticas*

La terapia con células madre hematopoyéticas (HSCT) se basa en el principio de que las células donantes derivadas de la médula ósea secretan la enzima lisosómica y esta puede circular en sangre y entregarse a varios tejidos, degradando el GAG acumulado. Sin embargo, esta terapia tiene un efecto limitado sobre las lesiones óseas y cartilaginosas debido a la perfusión limitada y la densa MEC que dificulta la penetración celular de la enzima (57).

Los estudios realizados con pacientes de MPS IVA a quienes se aplicó HSCT como tratamiento, revelan que esta terapia es útil en el mejoramiento de la función respiratoria y reduciendo el riesgo de valvulopatía cardíaca, así como el retraso de la displasia esquelética. Sin embargo, tiene un impacto limitado en el crecimiento general y en general las anomalías esqueléticas preexistentes (59).

#### **1.4.5. Terapia génica**

La terapia génica para MPS IVA aún no está disponible en la práctica clínica. Sin embargo, tiene gran potencial ya que se considera como medicina regenerativa y se espera que sea un tratamiento único curativo (57).

Aunque la terapia génica en un modelo de ratones adultos con MPS VII mostró una mejoría en órganos como el hígado, el bazo y el riñón, no hubo ningún efecto sobre las

lesiones esqueléticas y cerebrales, probablemente por la baja penetración de los vectores en la edad adulta. La respuesta inmune también puede afectar la eficacia terapéutica en ratones maduros. Sin embargo, el tratamiento en el período neonatal evidenció mejoría en las lesiones esqueléticas, por lo que la terapia génica temprana probablemente sea importante para prevenir eficazmente las lesiones patológicas irreversibles en pacientes con MPS (60).

Uno de los estudios más prometedores en el campo de la terapia génica para la MPS IVA fue llevado a cabo por Leal et al. En este trabajo, se implementó un sistema de edición genética basado en CRISPR/Cas9-nickasa para introducir un segmento de ADN conteniendo el gen *GALNS* funcional en un modelo murino. Los resultados fueron exitosos al demostrar una inserción precisa del gen, lo que resultó en un aumento sostenido y a largo plazo de la actividad de la enzima GALNS, alcanzando niveles de hasta el 40% de los valores normales. Asimismo, se observó una mejora en marcadores biológicos relevantes para la MPS IVA, incluyendo la normalización de la masa lisosomal, la reducción de los niveles de GAGs y la disminución del estrés oxidativo (61).

Estos hallazgos sugieren un potencial terapéutico prometedor para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, es importante destacar que se requieren más investigaciones para validar la seguridad y eficacia de este enfoque antes de realizar los ensayos clínicos. Además, la afectación esquelética única de Morquio A requiere el desarrollo de un método de administración de genes eficaz para las lesiones óseas y cartilaginosas, lo cual sigue siendo un desafío actualmente (57,62).

## **1.5. Genética poblacional**

### **1.5.1. Deriva genética y efecto fundador**

La teoría de la selección natural sostiene que algunos individuos de una población tienen rasgos que les permiten sobrevivir y producir más descendencia, mientras que otros individuos tienen rasgos que son perjudiciales y pueden hacer que mueran antes de reproducirse. Durante generaciones sucesivas, estas presiones de selección pueden cambiar el acervo genético y los rasgos dentro de la población. A diferencia de la selección natural, la deriva genética describe el efecto del azar en las poblaciones en ausencia de presión de selección positiva o negativa. Por lo tanto, la deriva genética es el cambio de alelos dentro de una población debido a eventos fortuitos que hacen que muestras aleatorias de la población se reproduzcan o no (63).

El efecto de la deriva genética puede ser mucho mayor cuando ocurren eventos fortuitos que modifican las frecuencias alélicas de la población, tales como fenómenos naturales que eliminan al azar una parte de la población, lo que se conoce como “cuello de botella”.

Adicionalmente, si una parte de la población migra de un sitio geográfico a otro, esto puede modificar la frecuencia alélica con relación a la población original, ocasionando un fenómeno de efecto fundador (64).

### **1.5.2. Efecto Fundador en Genética Humana**

Un efecto fundador se origina cuando una nueva población se establece a partir de un pequeño grupo de individuos fundadores. Estos fundadores llevan consigo solo una fracción de la diversidad genética de la población original, lo que resulta en una disminución de la diversidad genética y patrones de frecuencia de alelos distintivos en la nueva población (65) .

Una población que ha sido el resultado de un efecto fundador se caracteriza por: i) la pérdida de la diversidad genética, reflejada en la disminución del número de alelos, ii) la fijación de alelos y iii) el incremento en el nivel de desequilibrio de ligamiento por la pérdida de haplotipos en la población (66,67).

Es así, como en las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios que, de manera consistente, sugieren la hipótesis del efecto fundador como un marco explicativo para la alta prevalencia de alelos patogénicos, siendo estos la raíz de enfermedades raras en grupos poblacionales específicos.

Un ejemplo destacado de este fenómeno se encuentra en la población de Judíos Ashkenazi (AJ), donde se observa una incidencia elevada de patologías relacionadas con el almacenamiento de lípidos (LSD), que incluyen la enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Gaucher, mucopolisidosis tipo IV y enfermedad de Niemann-Pick (68). Investigaciones recientes han fortalecido la validez de la hipótesis del efecto fundador para explicar todos los casos de LSD en esta población, al confirmar que no existían diferencias significativas en (a) edades estimadas de los alelos, (b) números de alelos asociados a enfermedades y (c) orígenes geográficos inferidos de los alelos entre las LSD y las enfermedades sin almacenamiento de lípidos. Esto respalda la noción de que estos rasgos genéticos específicos, compartidos por ambas categorías de enfermedades, tienen un origen fundador común (68).

Asimismo, en un estudio realizado en pacientes italianos con miopatía relacionada con la Calsequestrina 1 (CASQ1), un trastorno muscular caracterizado por calambres y debilidad muscular en la edad adulta, se identificaron 22 pacientes, de los cuales 21 portaban la variante patogénica CASQ1:p.Asp244Gly y sólo un paciente portaba una variante genética diferente. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la concentración de alelos patogénicos en esta población puede atribuirse a eventos fundadores (69).

En el contexto del síndrome de leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales (HLRCC), se realizó un análisis de haplotipos en los individuos portadores de la variante *FH:c.1118A>G* en Alicante, España. Este análisis confirmó que la mutación se originó hace 12 a 26 generaciones a partir de un ancestro fundador, lo cual proporciona una explicación para la alta frecuencia de HLRCC observada en la dicha provincia (70).

En adición, en un estudio centrado en pacientes con trombocitemia hereditaria, una enfermedad rara caracterizada por un aumento en la megacariopoyesis que lleva a una sobreproducción de plaquetas, se realizó un análisis de haplotipos mediante microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido en nueve familias, ocho italianas y una japonesa, todas portadoras de la variante patogénica *MPL-G1073A*. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de un haplotipo común entre las familias italianas, sugiriendo la posible existencia de un efecto fundador (71).

Además del posible efecto fundador en la transmisión generacional de alelos patogénicos, la endogamia y la selección de alelos recesivos también son aspectos relevantes para entender la prevalencia y transmisión de enfermedades genéticas en poblaciones específicas.

### **1.5.3. Selección de alelos recesivos**

La selección ocurre cuando individuos con fenotipos particulares sobreviven a la madurez sexual a tasas más altas que aquellos con otros fenotipos (72).

El coeficiente de selección es una medida que representa la fuerza de selección frente a los homocigotos recesivos en relación con los otros genotipos. Cuando la fuerza de selección es igual a 1, esto significa un cambio de frecuencias alélicas en la población, aumentando la frecuencia del alelo dominante y disminuyendo la frecuencia del alelo recesivo, lo que conduce a la pérdida de equilibrio de las frecuencias genotípicas. Pese a la disminución de la frecuencia del alelo recesivo, cuando este es raro o poco frecuente, la mayoría de las copias de la población se encuentran en individuos heterocigotos o portadores, donde están efectivamente ocultos de la selección y de esta manera logran pasar de una generación a otra (73).

### **1.5.4. Ancestría global**

El análisis de la ancestría global es una herramienta fundamental en genómica y estudios de población. Se enfoca en determinar la composición ancestral de los individuos, identificando la mezcla de ascendencia proveniente de diferentes poblaciones o grupos étnicos. Este enfoque se basa en marcadores genéticos distribuidos en todo el genoma,

los cuales reflejan la diversidad genética y permiten inferir la ascendencia ancestral de un individuo (74).

Actualmente, estos estudios son cruciales para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (95–97), especialmente las de origen genético.(75–77) Además, son fundamentales en la medicina personalizada debido a la influencia significativa que los factores genéticos específicos de cada grupo étnico pueden tener en las respuestas individuales a los tratamientos (75).

Una investigación realizada por Lee et.al. en niños con leucemia linfoblástica aguda reveló asociaciones significativas entre la ascendencia genética y los subtipos moleculares de la enfermedad. Además, se observó que las ascendencias africana y amerindia estuvieron vinculadas con peores resultados en la supervivencia general. Estos hallazgos resaltan la importancia de tomar en cuenta los subtipos moleculares como parte de un enfoque de tratamiento personalizado y subrayan la relevancia de la ascendencia genética en el manejo médico de la patología(75).

Un estudio reciente en pacientes con melanoma uveal (UM) se centró en explorar la relación entre la composición genética y los marcadores predictivos del UM. En esta investigación se identificaron marcadores genéticos específicos y haplotipos asociados con un mal pronóstico de los pacientes. Estos hallazgos respaldan los efectos de la ascendencia genética en los marcadores pronósticos en el curso de la enfermedad (78).

En resumen, determinar la ascendencia genética es un factor determinante en la variabilidad de las respuestas a tratamientos y resultados de enfermedades, reafirmando la necesidad de considerar este aspecto en la medicina personalizada y en el pronóstico de los pacientes con Síndrome de Morquio tipo IVA para mejorar la efectividad de los tratamientos y la calidad de vida de los pacientes.

### **1.6. Detección de variantes fundadoras**

La identificación de variantes genéticas fundadoras puede llevarse a cabo mediante distintos enfoques, ya sea basados en la genética clásica o en la genómica avanzada. Estos métodos se centran en revelar aquellas variantes genéticas específicas que han surgido en poblaciones aisladas y que, a lo largo del tiempo, han llegado a tener una frecuencia significativa en dichas comunidades (79).

Los enfoques basados en la genética clásica incluyen el análisis de marcadores individuales y múltiples. El análisis de marcador único implica el mapeo del desequilibrio de ligamiento entre el marcador y el gen causante de la enfermedad, centrándose en la relación entre un marcador específico y la variante genética asociada. Por otro lado, el análisis de múltiples marcadores polimórficos ofrece un mapeo más detallado y de mayor

resolución de la asociación entre la variante fundadora y la enfermedad, permitiendo una visión más completa de la diversidad genética. En contraste, los enfoques basados en la genómica se enfocan en la detección de haplotipos que mapean la variación fundadora, en asociación con una patología. Este enfoque analiza la estructura genómica más amplia, considerando la información de múltiples marcadores genéticos cercanos, lo cual es especialmente útil para comprender la historia genética de una población y su susceptibilidad a enfermedades específicas (79).

Estos tres enfoques son valiosos para descubrir y caracterizar variantes genéticas fundadoras. Sin embargo, el análisis de haplotipos se ha consolidado como el método de elección para llevar a cabo este tipo de estudios, ya que posibilita la exploración de patrones precisos de transmisión de alelos en familias y poblaciones, lo cual es particularmente eficaz en contextos clínicos y de investigación genética (80–82).

Un ejemplo de la utilidad del análisis de haplotipos se evidencia en un estudio que evaluó seis mutaciones frecuentes del gen *GJB2* asociadas a la pérdida de audición en pacientes japoneses. Este estudio reveló que todas las mutaciones compartían un haplotipo específico, lo cual sugiere un origen común debido a efectos fundadores. Este descubrimiento aporta significativamente al conocimiento sobre la historia genética y los mecanismos subyacentes a la pérdida de audición relacionada con el gen *GJB2* (80).

Del mismo modo, se realizó un estudio en población coreana donde se analizaron haplotipos de pacientes con variantes patogénicas o probablemente patogénicas en los genes *BRCA1/BRCA2* con posible efecto fundador. Los resultados sugirieron que las variantes *BRCA1*:c.5339T>C (p.Leu1780Pro) y *BRCA2*:c.1339A>T (p.Lys467\*), vinculadas al cáncer hereditario de mama u ovario, son variantes fundadoras de la población coreana (81).

Además, un estudio llevado a cabo en pacientes con poliquistosis renal autosómica dominante (PQRAD) en Taiwán, demostró que el 80% de las familias portadoras de la variante patogénica *PKD2*:p.Arg803Ter compartían el mismo haplotipo en una región de 250 kb. Este hallazgo sugiere un efecto fundador asociado a dicha variante (83).

### **1.6.1. Metodologías para el análisis de haplotipos**

Los microsatélites son repeticiones en tándem de motivos cortos de ADN, compuestos de 1 a 6 nucleótidos, que se distribuyen a lo largo del genoma eucariota. Estos elementos exhiben altas tasas de mutación en humanos, lo que genera regiones altamente polimórficas. Por esta razón, son ampliamente utilizados en estudios de asociación y genética de poblaciones ((84).

Las metodologías que utilizan microsatélites para la construcción de haplotipos generalmente se basan en la amplificación por Reacción en Cadena de la ADN polimerasa (PCR), utilizando cebadores marcados con fluorocromos específicos, para amplificar las regiones donde se encuentran los microsatélites. Una vez amplificados, estos fragmentos se separan por electroforesis capilar, lo que permite identificar el número exacto de repeticiones de cada microsatélite (83,85).

Otra de las metodologías para evaluar variantes fundadoras se basa en el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en una región definida o, incluso, genomas completos (86). Estos marcadores permiten estudiar el desequilibrio de ligamiento (LD) y construir haplotipos en regiones cercanas a la variante genética de interés. Un enfoque común es la identificación de haplotipos. Para ello, se han utilizado herramientas como Haploview para evaluar el LD y definir bloques haplotípicos, así como Beagle para la imputación y faseo de variantes (87,88). La comparación de estos haplotipos entre individuos portadores de la variante y poblaciones de referencia, permite determinar si la variante fundadora se originó a partir de un solo evento mutacional (81,86).

En comparación con los SNPs, los microsatélites permiten una mejor resolución de haplotipos a nivel local debido a su alta variabilidad alélica, lo que facilita detectar recombinaciones recientes y eventos de expansión de poblaciones. Sin embargo, la complejidad en su amplificación y análisis, junto con su naturaleza repetitiva, puede complicar la interpretación de datos, lo cual representa una mayor dificultad para inferir la ancestralidad exacta del haplotipo (89). Además, el uso de SNPs para la construcción de haplotipos ha ganado popularidad debido a la facilidad de automatización y la capacidad de analizar regiones más amplias con mayor precisión (89).

### **1.6.2. Análisis de haplotipos en síndrome de Morquio**

A pesar de la alta variabilidad alélica observada en los pacientes con MPS IVA, se han reportado alelos patogénicos de mayor frecuencia en regiones geográficas específicas (90). Sin embargo, los estudios sobre los posibles efectos fundadores de estas variantes son escasos, lo que subraya la necesidad de realizar una caracterización genética más detallada para comprender su impacto local.

La mayoría de los estudios publicados, hasta la fecha, de variantes fundadoras en MPS IVA se basan en el estudio de seis SNPs intragénicos en el gen *GALNS*, que fueron publicados por primera vez por Tomatsu, et. al. (91) en pacientes japoneses con esta patología (91–94).

Un estudio realizado en Túnez, en 15 pacientes con MPS IVA, reveló que los 11 pacientes que portaban la variante patogénica c.120+1G>A, en homocigosis, compartían el

haplotipo común ABcHde, mientras que los controles compartieron el haplotipo abchDE, no presente en los pacientes. Estos datos aportan evidencia sobre el efecto fundador de la variante intrónica c.120+1G>A en los pacientes tunecinos (95).

En Brasil, la variante p.S341R ha mostrado tener una frecuencia alélica aumentada en pacientes con MPS IVA. Un estudio que analizó los haplotipos de 63 afectados demostró que todos los pacientes que portaban esta variante (n=11) compartían el haplotipo abhcde, y todos provenían de la región Nordeste, principalmente del estado de Paraíba, lo que apoya la teoría del efecto fundador en esta región (96)

En un estudio realizado en Canadá, se incluyeron 33 pacientes con MPS IVA. De estos, 17 pacientes portaban la variante patogénica p.M391V, la cual se asoció con un fenotipo no clásico (atenuado) de la enfermedad. Aunque el análisis no incluyó estudios de haplotipos, la frecuencia de la variante p.M391V plantea la posibilidad de un efecto fundador en esta población (97). De manera similar, en Chile se llevó a cabo un estudio que incluyó a 12 pacientes, en el cual se reportó la variante c.319+2T>C en el 42% de los alelos analizados. Todos los pacientes que presentaron esta variante compartían características geográficas y étnicas que sugieren la existencia de un efecto fundador en esta población (98).

Finalmente, en un estudio realizado en India que incluyó a pacientes de 23 familias no relacionadas de Gujarat, se observó una alta prevalencia de la variante p.P77R, la cual se postula como una variante fundadora en esta población. Esta variante estaba significativamente asociada con un haplotipo que incluía los marcadores rs11076715, rs11076716 y rs377453859, abarcando una longitud genómica total de 28,3 kb en el gen *GALNS* (99).

## OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Evaluar la posible existencia de un efecto fundador de la mutación p.G301C en el gen *GALNS* en pacientes colombianos diagnosticados con Mucopolisacaridosis tipo IVA.

### ***Objetivos específicos***

1. Caracterizar el perfil clínico y molecular de los pacientes con Mucopolisacaridosis tipo IVA en Colombia
2. Analizar bloques de haplotipos del gen *GALNS* en pacientes con MPS IVA, con el fin de determinar su asociación con la mutación p.G301C.
3. Estimar la ancestría genética global y local de los individuos colombianos con MPS IVA, a través de la secuenciación del genoma completo.

# **CAPÍTULO I: Caracterización clínica y molecular de los pacientes con Mucopolisacaridosis tipo IVA en Colombia**

## **1.1. METODOLOGÍA**

### ***Población y muestra***

Se incluyó una muestra por conveniencia compuesta por 35 pacientes colombianos con sospecha o diagnóstico de Mucopolisacaridosis tipo IVA (Síndrome de Morquio) y sus respectivos padres biológicos.

### ***Criterios de selección***

#### *Criterios de inclusión*

Toda persona mayor o menor de edad, nacida en Colombia, con al menos dos generaciones de ascendencia materna previa al caso índice (madre y abuela), originarias de Colombia, con sospecha o diagnóstico de mucopolisacaridosis tipo IVA, que cumpla con al menos uno de los siguientes parámetros:

- a. Prueba de actividad enzimática de *GALNS* reducida o ausente
- b. Prueba molecular con variantes genéticas bialélicas patogénicas o probablemente patogénicas en el gen *GALNS*.

#### *Criterios de exclusión*

- Paciente nacido en Colombia, pero con padres biológicos oriundos de otros países.
- Paciente que ha recibido transfusión de sangre en un periodo menor a 4 meses.
- Paciente sometido a trasplante de médula ósea y/o células madre hematopoyéticas.

### ***Captación de participantes***

#### *Consentimiento informado*

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi, bajo el acta de aprobación No. 365 y del Comité de Ética en Investigación en Salud (CEIS) de la Universidad del Valle, bajo el acta 001-021.

El consentimiento informado de todos los participantes se obtuvo en un espacio adecuado, donde se explicaron los riesgos, beneficios y aspectos relevantes del proyecto. Tras aclarar dudas y asegurar el entendimiento, se procedió con la firma del consentimiento y el asentimiento (ANEXO 1: CONSENTIMIENTO Y ASENTIMIENTO INFORMADO), si correspondía.

### ***Caracterización clínica***

La caracterización clínica de los participantes incluyó la recolección de datos sociodemográficos y una evaluación médica detallada realizada por un médico genetista, quien registró la información en los formularios diseñados para este propósito (ver ANEXO 2: DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS y ANEXO 3: DATOS CLÍNICOS). Este proceso dependió de la colaboración activa de los participantes, y la ausencia de algún dato no se consideró un criterio de exclusión, garantizando la inclusión de todos los datos de individuos que cumplieran con los criterios generales del estudio.

Todos los datos recopilados fueron anonimizados y almacenados en una base de datos digital en Microsoft Access, protegida mediante contraseña, cumpliendo con los estándares de seguridad y confidencialidad.

El análisis estadístico de las variables se llevó a cabo utilizando medidas de tendencia central, como la media y la mediana, para las variables cuantitativas, mientras que las frecuencias absolutas y relativas se emplearon para las variables categóricas.

### ***Caracterización molecular***

#### *Toma de muestras*

Para cada participante, se tomó una muestra de 4mL de sangre periférica en tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA. En aquellos participantes donde no fue posible obtener sangre, se obtuvo fluido oral utilizando el kit comercial ORAGENE DNA OG-575 (DNAgenotek), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### *Extracción de ADN*

La extracción de ADN genómico se realizó usando el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) a partir de una muestra de 250µl de sangre o 500µl de fluido oral, según las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del ADN obtenido fue determinada por

espectrofotometría en un equipo Nanodrop2000® UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

Para confirmar el diagnóstico de MPS IVA, se realizó el tamizaje de variantes bialélicas patogénicas o probablemente patogénicas mediante secuenciación Sanger. Dada la alta frecuencia de la variante GALNS:p.G301C, se inició el tamizaje con la amplificación del exón 9, donde se localiza esta variante. En caso de obtener un resultado negativo, se secuenciaron los exones 11, 2, 5 y 7. Si estos también resultaban negativos, se procedió a secuenciar los demás exones.

#### *Amplificación por PCR*

Se emplearon los primers reportados previamente por Wang y cols. para la amplificación de los 14 exones del gen *GALNS*, así como las regiones intrónicas flanqueantes de cada una de las regiones codificantes (32). Se llevó a cabo una PCR convencional, en singleplex para cada exón tamizado, en un volumen final de 25uL conteniendo: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0,4mM de cada uno de los primers, 0.2mM dNTPs, 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen®) y 100 ng de ADN por reacción. Para los ciclos térmicos se utilizó el termociclador Swift™ MiniPro Thermal Cycler (ESCO), de acuerdo con las condiciones de termociclado específicas para cada pareja de primers (32). Los productos amplificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, a 80 V durante 30 minutos, utilizando el marcador de peso molecular MassRuler® DNA ladder Low Range (ThermoFisher Scientific). Se empleó el agente intercalante SYBR Safe® para la visualización de los productos.

#### *Secuenciación Sanger*

Para la purificación de los productos amplificados, se utilizó el kit EZNA® Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Para la secuenciación, se empleó el kit de secuenciación Big Dye Terminator 3.1 (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la reacción fueron analizados, por electroforesis capilar, en el equipo ABI Prism 3500 (Applied Biosystems). La revisión de los parámetros de calidad de los electroferogramas obtenidos, así como la asignación de bases, se realizó en el programa Sequencing Analysis v6.0 (ThermoFisher Scientific).

#### *Detección de variantes*

Los análisis de las secuencias se llevaron a cabo mediante la herramienta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que permitió alinear la secuencia de referencia

del gen *GALNS* (NG\_008667.1) con las secuencias obtenidas, para identificar las variantes genéticas presentes en cada paciente.

## **1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Población**

La población de estudio incluyó 35 pacientes colombianos con diagnóstico bioquímico de MPS IVA, confirmado a través de la medición de actividad enzimática de galactosamina-6-sulfatasa en leucocitos. Adicionalmente, se incluyeron sus padres biológicos para los análisis genéticos. A cada paciente se le asignó un código único consecutivo, iniciando desde MOR001 hasta MOR035, garantizando la anonimidad de los datos en el análisis.

### **Caracterización clínica**

#### *Sociodemográficos*

De los 35 pacientes con MPS IVA incluidos en el estudio, el 57,1% (19 de 35) eran de sexo femenino y el 42,9% (16 de 35) de sexo masculino. La edad promedio de los participantes fue de 21 años, con un rango de 6 a 52 años (Tabla 3; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

En cuanto a la distribución geográfica por lugar de nacimiento, el departamento con mayor representación fue Risaralda, con 42,9% (15 de 35) de los casos, seguido por Valle del Cauca con 37,1% (13 de 35), y Caldas con 8,6% (Figura 1). A nivel de ciudades, Pereira presentó el mayor número de participantes, con 31,4% (11 de 35), seguida por Cali con 11,4% (4 de 35).

Respecto al sistema de salud, 51,4% (18 de 35) de los participantes estaban afiliados al régimen subsidiado, 28,6% (10 de 35) al régimen contributivo, 5,7% (2 de 35) al régimen especial, y un paciente, que corresponde al 2,9% (1 de 35), no estaba afiliado a ningún sistema de salud.

Con relación a las características socioeconómicas, el 25,7% (9 de 35) de los participantes pertenecían al estrato 2, el 20% (7 de 35) al estrato 1, otro 20% (7 de 35) al estrato 3 y solo se contó con un participante del estrato 4. Por otra parte, el mayor porcentaje de participantes se identificó como mestizo (14 de 35), seguido por el 20% (7 de 35) que se identificó como blancos.

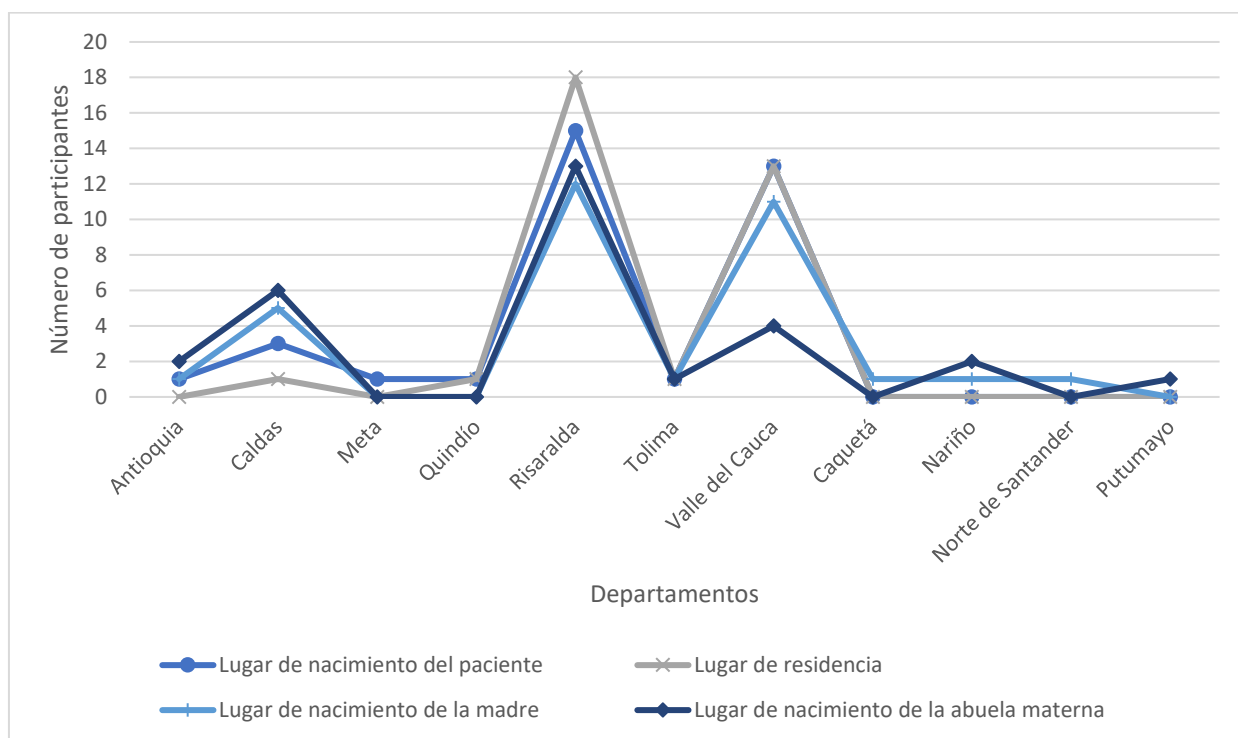


Figura 1. Distribución geográfica de los participantes por departamento.

## Diagnóstico

La sospecha clínica de MPS IVA ocurrió, en promedio, a los 8 años de edad, con una mediana de 3 años. Los rangos de edad fueron amplios, oscilando entre el primer mes de vida y los 48 años. En cuanto al diagnóstico clínico definitivo, este se realizó en promedio a los 11 años, con una mediana de 5 años, con rangos que oscilaron desde los 2 hasta los 48 años (Figura 2).

Si bien el promedio de edad al diagnóstico excede los valores reportados internacionalmente, la mediana coincide con el patrón global de diagnóstico antes de los 5 años, lo que sugiere la existencia de casos detectados tempranamente, compensando parcialmente los retrasos observados en otros pacientes. Estos hallazgos destacan tanto la heterogeneidad en los tiempos de diagnóstico como la necesidad de mejorar la identificación temprana en el contexto local (7).

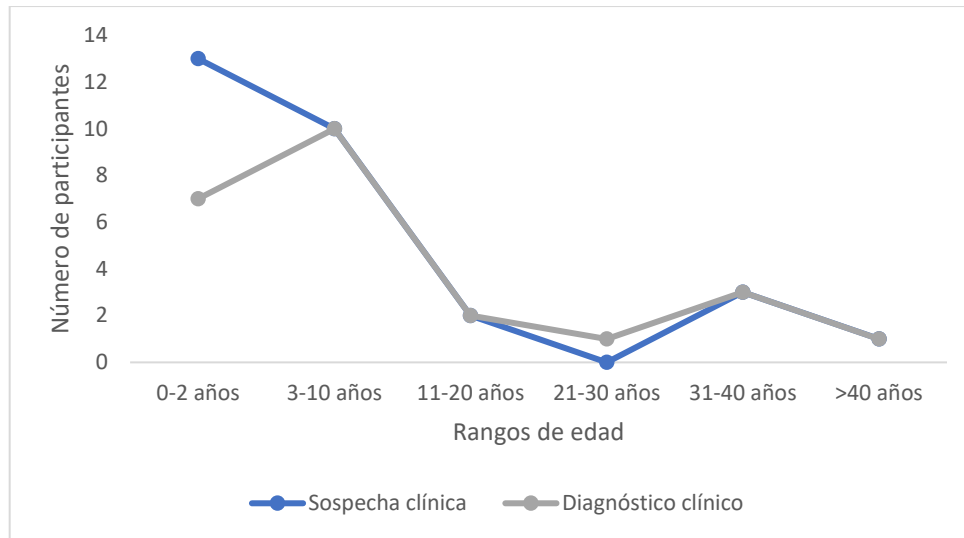


Figura 2. Comparación de la edad de sospecha y diagnóstico clínico en los participantes

Se recopiló información de los padres sobre las primeras manifestaciones que generaron sospecha de la enfermedad. Los resultados se resumen empleando términos fenotípicos estandarizados del Human Phenotype Ontology (HPO). Entre los hallazgos más frecuentes se identificaron: HP:0000768 (*pectus carinatum*), presente en 14 pacientes; HP:0001288 (alteración en la marcha), reportada en 6 pacientes; HP:0002652 (displasia esquelética), en 5 pacientes; y HP:0004322 (talla baja), también observada en 5 pacientes. Estos resultados son consistentes con la literatura, que describe el *pectus carinatum*, la talla baja y las alteraciones en la marcha como las manifestaciones iniciales más comunes de la enfermedad (10,36,38).

Otros síntomas frecuentemente reportados, como el HP:0002816 (genu valgo) y la HP:0002808 (cifosis), se observaron con menor frecuencia en esta cohorte, registrándose en 4 y 1 paciente, respectivamente. En total, se identificaron 17 términos HPO diferentes, lo que refleja la amplia diversidad fenotípica de la enfermedad en esta cohorte (Figura 3).

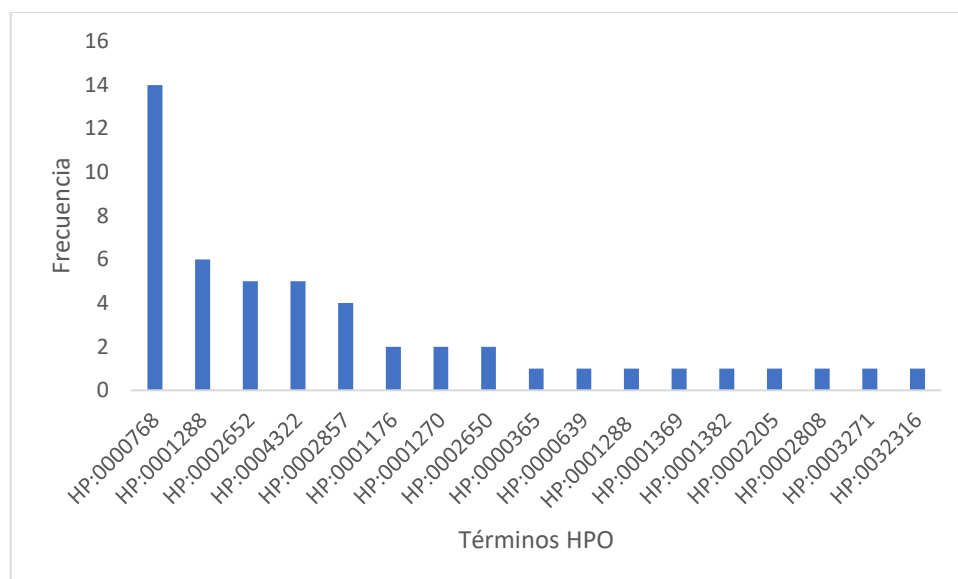


Figura 3. Frecuencia de los términos HPO en la sospecha clínica de los pacientes.

En relación con los métodos diagnósticos empleados, se observó que el 31.4% de los pacientes (11 de 35) fueron diagnosticados mediante pruebas enzimáticas, el 17.1% (6 de 35) mediante una combinación de dos tipos de pruebas, el 11.4% (4 de 35) mediante las tres pruebas disponibles (enzimáticas, moleculares y análisis de uGAGs), el 2.9% (1 de 35) únicamente con pruebas moleculares y otro 2.9% (1 de 35) mediante análisis de glicosaminoglicanos urinarios (uGAGs). Sin embargo, el 34.3% (12 de 35) de los casos no contaba con información sobre el método diagnóstico utilizado. Los valores de la actividad de la enzima galactosamina 6-sulfatasa en leucocitos oscilaron entre 0 y 0.3nmol/mg prot/h, confirmando una actividad enzimática severamente reducida, lo cual es típico en los fenotipos severos de la enfermedad (100,101).

Adicionalmente, solo 9 pacientes contaban con un diagnóstico molecular, lo cual representa un aspecto crítico para el adecuado asesoramiento genético individual y familiar. Este tipo de diagnóstico no solo permite confirmar la etiología genética, sino que también es esencial para el análisis de correlaciones genotipo-fenotipo y para estudios de ancestralidad, como los relacionados con el efecto fundador (79,96,98,99,102).

Las pruebas enzimáticas, como la medición de la actividad de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) en leucocitos o fibroblastos, son consideradas el estándar, debido a su alta especificidad y sensibilidad (103–105). Estudios recientes enfatizan que la realización de pruebas moleculares puede acelerar el diagnóstico y proporcionar información adicional sobre variantes genéticas asociadas a la severidad de la enfermedad (106). En nuestro estudio, solo el 25.7% de los casos fueron diagnosticados con pruebas moleculares, lo cual contrasta con los enfoques actuales que promueven el uso de herramientas genómicas en combinación con pruebas enzimáticas (90,107,108).

El análisis de uGAGs, aunque es útil como prueba de tamizaje, tiene limitaciones debido a su baja especificidad, ya que niveles elevados pueden observarse en otras mucopolisacaridosis o incluso en condiciones clínicas no relacionadas (97,103,104). La baja proporción de casos diagnosticados exclusivamente con esta técnica en nuestra cohorte (2.9%) coincide con la tendencia reportada en la literatura hacia su uso como prueba complementaria (103).

El hallazgo de que un 34.3% de los pacientes no tuviera datos sobre el método diagnóstico refleja una brecha importante en los registros clínicos. Esta deficiencia limita el análisis epidemiológico y dificulta la implementación de estrategias de diagnóstico temprano, las cuales han demostrado mejorar el pronóstico mediante la iniciación oportuna de la terapia de reemplazo enzimático (109).

### *Tratamiento*

En cuanto al tratamiento, 30 (85%) pacientes reportaron haber recibido terapia de reemplazo enzimático, con VIMIZIM (elosulfase alfa), en algún momento de su vida. Sin embargo, solo 24 estaban en tratamiento activo al momento de la captación. Entre los 6 pacientes que presentaron discontinuidad en el tratamiento, 4 indicaron efectos adversos como taquicardia, alergias, depresión y urticaria como las principales razones para suspender la terapia. Uno de los pacientes atribuyó la interrupción a dificultades relacionadas con el sistema de salud, específicamente la falta de autorización por parte de su EPS en régimen subsidiado. El último caso no especificó las causas de la suspensión. Adicionalmente, 4 pacientes informaron haber pausado su tratamiento debido a la pandemia de COVID-19, mencionando el miedo generado por la emergencia sanitaria como un factor determinante en su decisión.

La interrupción del tratamiento en enfermedades raras representa un desafío significativo para garantizar una atención adecuada y continua. Los efectos adversos reportados en esta cohorte (taquicardia, alergias, depresión y urticaria) son consistentes con lo descrito en la literatura sobre las terapias de reemplazo enzimático (TRE), las cuales, aunque efectivas en muchos casos, pueden desencadenar reacciones adversas en una proporción de los pacientes (110,111). La identificación temprana y el manejo adecuado de estas reacciones son esenciales para mejorar la adherencia y evitar interrupciones que puedan impactar negativamente en la progresión de la enfermedad (109).

El caso del paciente que enfrentó barreras administrativas en el acceso al tratamiento refleja problemas estructurales en los sistemas de salud, particularmente en países de ingresos medios como Colombia. Estas dificultades suelen estar relacionadas con la burocracia, la falta de recursos y los costos elevados asociados a las TRE, factores que

pueden limitar el acceso oportuno y equitativo al tratamiento en pacientes con enfermedades raras (112) .

Finalmente, el impacto de la pandemia de COVID-19 en la continuidad del tratamiento resalta una vulnerabilidad adicional para estos pacientes. Estudios recientes han documentado cómo la emergencia sanitaria global exacerbó la interrupción de terapias crónicas debido a restricciones de movilidad, temor al contagio y priorización de recursos hacia la atención de la pandemia (113).

#### *Evaluación médica: Hallazgos más frecuentes*

Las características clínicas del síndrome de Morquio A presentan una amplia variabilidad. Al consultar el término "GALNS" en la plataforma HPO online (<https://hpo.jax.org/>), se identificaron 50 anotaciones asociadas a la MPS IVA, reflejando la complejidad fenotípica de esta enfermedad. En este estudio, se evaluaron las características más relevantes en cada paciente; sin embargo, la recopilación de información completa se vio limitada por factores como la falta de seguimiento clínico y manejo integral de la enfermedad en esta población, así como por la limitada accesibilidad a resultados de exámenes médicos, que en algunos casos solo estaban disponibles en copias físicas bajo la custodia de los propios pacientes. Estas condiciones incrementan el riesgo de pérdida de información relevante.

No obstante, a pesar de estas limitaciones, se confirmó un fenotipo severo en todos los participantes, empleando los siguientes criterios diagnósticos: retraso en el crecimiento con una altura adulta inferior a 125 cm, aparición temprana de síntomas antes de los 3,5 años y la presencia de cambios esqueléticos característicos documentados mediante radiografías (114).

Entre los hallazgos clínicos más frecuentes en la población estudiada fueron: HP:0000470 (cuello corto) y HP:0000768 (pectus carinatum), observados en 29 pacientes cada uno. Otras manifestaciones comunes incluyeron HP:0003049 (desviación cubital de las muñecas) en 28 pacientes, y HP:0001552 (tórax en tonel) en 26 pacientes. Además, se identificaron HP:0000687 (dientes espaciados), HP:0002857 (genu valgo) y HP:0001288 (alteración en la marcha) en 25 pacientes cada uno.

También se documentaron prognatismo y maloclusión en 24 pacientes, deformidad en codos en 23, facies toscas y cifosis toracolumbar en 22, hipoplasia de esmalte en 20, y macroglosia y escoliosis en 18 pacientes cada uno. Estos datos resaltan el predominio de manifestaciones esqueléticas y craneofaciales en esta cohorte, subrayando la heterogeneidad fenotípica observada (Figura 4).

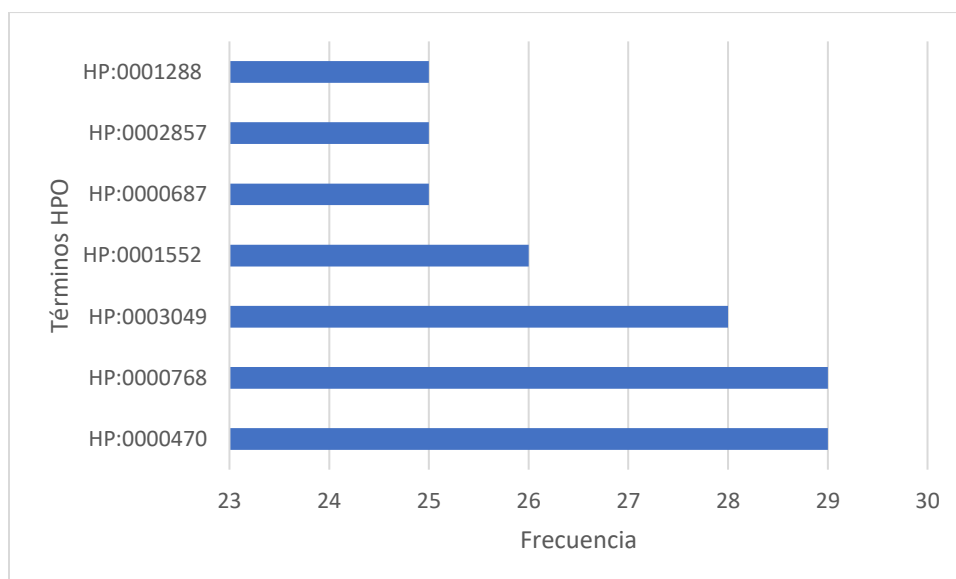


Figura 4. Hallazgos clínicos más prevalentes en la población estudiada.

La diversidad y frecuencia de las características clínicas musculoesqueléticas observadas en esta población coinciden con los fenotipos reportados previamente para MPS IVA, especialmente en pacientes con fenotipos severos (101,109).

Las dificultades logísticas en la recolección de información clínica, como la dependencia de registros en copias físicas, reflejan una brecha en la implementación de sistemas de registro clínico en enfermedades raras, lo que podría limitar el acceso a información clave para estudios longitudinales y análisis genotipo-fenotipo (102,115)

*Evaluación médica: otros hallazgos*

### ***Afectaciones respiratorias***

En esta cohorte, se identificaron 10 pacientes con apnea del sueño, 8 con hipertrofia tonsilar y 3 con patrón pulmonar restrictivo. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que destacan las complicaciones pulmonares restrictivas como una de las principales causas de morbilidad en estos pacientes, particularmente durante procedimientos anestésicos (103,109). Sin embargo, la falta de un seguimiento adecuado en nuestra población va en contra de las recomendaciones internacionales, que sugieren la realización de pruebas de función respiratoria a partir de los 5 años (46). Cabe destacar que la espirometría convencional suele ser difícil de realizar en estos pacientes debido a las deformidades torácicas, la talla baja y la hepatomegalia. En este contexto, se recomienda el uso de pruebas no invasivas que pueden facilitar el monitoreo temprano y reducir complicaciones respiratorias severas (116).

### ***Afectaciones cardiovasculares***

En cuanto a las alteraciones cardiovasculares, la información obtenida fue limitada, reflejando un seguimiento insuficiente en nuestra población. Solo 6 pacientes contaban con un ecocardiograma reciente, lo que restringe la capacidad de identificar y tratar oportunamente las anomalías cardíacas. A partir de las historias clínicas, se detectaron 5 pacientes con afectación no especificada de la válvula mitral, 4 con insuficiencia mitral, 3 con afectación no especificada de la válvula tricúspide, 2 con insuficiencia tricúspide, 2 con infiltración de miocardio, 1 con cardiomiopatía hipertrófica, 1 con anomalía de la válvula aórtica y 1 con estenosis aórtica. Estos hallazgos son comparables con estudios previos que reportan una alta prevalencia de insuficiencia valvular y otros defectos cardíacos, como insuficiencia mitral (50%) e insuficiencia aórtica (30%) en pacientes con Morquio A (117). Estos datos subrayan la necesidad de un monitoreo cardíaco sistemático, especialmente mediante ecocardiografía anual, para identificar y manejar oportunamente estas complicaciones (103,109).

### ***Pérdida auditiva***

La pérdida auditiva es otra complicación común pero poco estudiada en pacientes con MPS IVA. En este análisis, solo 13 pacientes contaban con una audiometría reciente, de los cuales 10 (77%) presentaron pérdida auditiva, lo que corresponde al 28.6% del total de pacientes evaluados. Este hallazgo coincide con la literatura, que reporta una alta prevalencia de pérdida auditiva en pacientes con Morquio A, atribuida principalmente a la displasia ósea y anomalías en la conducción (115). Sin embargo, persiste una falta de información sobre el tipo de sordera (conducción, neurosensorial o mixta) y su evolución con el tratamiento, lo que limita la implementación de estrategias adecuadas de rehabilitación auditiva (115).

### ***Intervenciones quirúrgicas***

En cuanto a las intervenciones quirúrgicas, el 48.6% de los pacientes (17 de 35) reportaron antecedentes quirúrgicos. Las cirugías más frecuentes incluyeron: 11 cirugías de rodilla, 4 amigdalectomías, 3 adenoidectomías, 3 descompresiones medulares, 3 fijaciones cervicales, 2 reparaciones de hernia, 2 cirugías de cadera, 1 osteotomía y 1 inserción de tubos ventilatorios. Este perfil quirúrgico refleja la alta frecuencia de complicaciones ortopédicas y respiratorias en esta población.

Los resultados de la caracterización clínica realizada en este estudio destacan las principales comorbilidades en los pacientes con fenotipos severos del síndrome de Morquio A, subrayando la importancia de un enfoque multidisciplinario integral para su manejo. Las complicaciones respiratorias y cardiovasculares emergen como las principales

amenazas para la calidad de vida y la supervivencia, lo que resalta la urgencia de implementar estrategias de monitoreo accesibles y adaptadas a las limitaciones de esta población.

Finalmente, las barreras de acceso a servicios especializados y al monitoreo adecuado identificadas en esta cohorte, destacan la urgencia de implementar políticas de salud pública que prioricen a los pacientes con enfermedades raras, promoviendo un manejo equitativo y oportuno de los pacientes.

### **Caracterización molecular**

Los 35 individuos fueron diagnosticados molecularmente mediante secuenciación Sanger, confirmando el diagnóstico clínico en el 100% de los casos (Tabla 3). La Figura 5 muestra la distribución alélica observada en la cohorte de pacientes analizados.

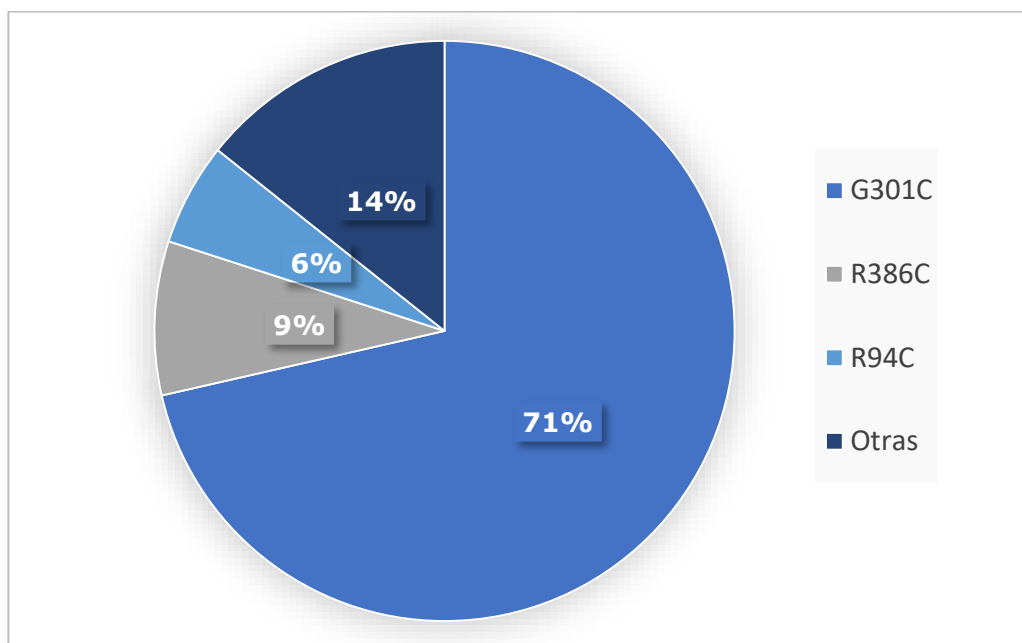


Figura 5. Distribución alélica de pacientes con MPS IVA

Tabla 3. Datos demográficos y moleculares de los pacientes con MPS IVA.

| Código | Sexo | Edad (años) | Departamento de nacimiento | Alelo 1 | Alelo 2 |
|--------|------|-------------|----------------------------|---------|---------|
| MOR001 | F    | 23          | Valle del Cauca            | G301C   | S80L    |
| MOR002 | M    | 25          | Valle del Cauca            | G301C   | R386C   |
| MOR003 | M    | 11          | Valle del Cauca            | G301C   | G301C   |
| MOR004 | F    | 8           | Valle del Cauca            | G301C   | 319+2   |

|        |   |    |                 |       |           |
|--------|---|----|-----------------|-------|-----------|
| MOR005 | M | 26 | Valle del Cauca | R386C | R386C     |
| MOR006 | F | 7  | Valle del Cauca | G301C | F216Sfs*3 |
| MOR007 | F | 8  | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR008 | M | 13 | Valle del Cauca | G301C | R386C     |
| MOR009 | F | 29 | Valle del Cauca | G301C | 320-1     |
| MOR010 | M | 12 | Valle del Cauca | G301C | R386C     |
| MOR011 | F | 13 | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR012 | M | 32 | Risaralda       | W325* | R94C      |
| MOR013 | F | 46 | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR014 | F | 13 | Meta            | G301C | G301C     |
| MOR015 | F | 40 | Risaralda       | G301C | W325*     |
| MOR016 | M | 35 | Caldas          | G301C | G301C     |
| MOR017 | F | 7  | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR018 | F | 25 | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR019 | M | 41 | Valle del Cauca | G301C | G301C     |
| MOR020 | M | 52 | Risaralda       | G301C | G333D     |
| MOR021 | M | 37 | Quindío         | G301C | G301C     |
| MOR022 | F | 39 | Risaralda       | G301C | R94C      |
| MOR023 | M | 11 | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR024 | M | 27 | Risaralda       | G301C | R386C     |
| MOR025 | F | 13 | Caldas          | G301C | G301C     |
| MOR026 | F | 21 | Valle del Cauca | G301C | R386C     |
| MOR027 | M | 21 | Antioquia       | G301C | G301C     |
| MOR028 | F | 14 | Risaralda       | G301C | R94C      |
| MOR029 | F | 28 | Caldas          | G301C | G301C     |
| MOR030 | M | 13 | Risaralda       | G301C | R386C     |
| MOR031 | M | 6  | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR032 | F | 11 | Risaralda       | G301C | G301C     |
| MOR033 | M | 8  | Valle del Cauca | G301C | G301C     |
| MOR034 | F | 18 | Valle del Cauca | R94C  | G333D     |
| MOR035 | F | 16 | Tolima          | G301C | G301C     |

En la muestra de estudio, el alelo patogénico c.901G>T (p.G301C) mostró la mayor frecuencia alélica, representando el 71% de los alelos evaluados (50 de 70), lo que indica una elevada frecuencia en la población afectada. Por su parte, el alelo c.1156C>T (p.R386C) fue detectado en el 9% de los alelos (6 de 70), situándose como la segunda variante patogénica más común. En tercer lugar, se ubicó la mutación R94C con el 6% de los alelos afectados.

La mutación p.G301C es una de las variantes más prevalentes del gen *GALNS*, especialmente en poblaciones latinoamericanas, destacando por su alta frecuencia en Colombia. También ha sido identificada en otras poblaciones, como Brasil, México, Chile, Portugal y España. Desde el punto de vista clínico, esta variante se asocia con fenotipos severos (clásicos) de MPS IVA, ya que su localización en el núcleo hidrofóbico de la enzima compromete la estabilidad estructural, resultando en una marcada reducción de la actividad catalítica, la cual se correlaciona directamente con la severidad del fenotipo.

La mutación p.R386C ha sido previamente reportada como patogénica y se asocia con una pérdida completa de la función enzimática de *GALNS*, característica de los fenotipos severos de MPS IVA. Esta variante ha sido ampliamente identificada en múltiples poblaciones, con mayor frecuencia en España (16% de los alelos p.R386C) y América Latina, incluyendo Brasil, México, Chile, Argentina y Colombia. Su distribución en estas regiones hispanoamericanas sugiere un posible origen compartido, mientras que su presencia esporádica en países como China, Italia y Turquía resalta la influencia de flujos migratorios (96,98,107).

Por otro lado, la variante p.R94C, que se asocia con fenotipos severos de MPS IVA, ha sido reportada principalmente en poblaciones del Medio Oriente, aunque también se ha detectado, en menor proporción, en poblaciones europeas, particularmente en Italia y España, así como en América Latina (107). La alta frecuencia de R94C en población asiática sugiere un posible efecto fundador en esta región, mientras que su presencia en Europa y América Latina podría estar vinculada a flujos migratorios históricos o al mestizaje (118).

Otras variantes patogénicas se identificaron con una menor frecuencia, representando el 14% de los alelos evaluados. Entre ellas se encuentran las variantes intrónicas c.320-1G>T y c.319+2T>C; la variante tipo frameshift o de cambio en el marco de lectura p.F216Sfs3 (c.647\_648delinsCCT); y las variantes tipo missense o de sustitución de aminoácidos p.S80L, p.G333D y p.W325.

La variante intrónica c.320-1G>T (p.A107GfsX54) fue reportada por primera vez en un paciente masculino de 13 años, de origen chileno y con un fenotipo atenuado, aunque no se detectó el segundo alelo patogénico en este paciente. Esta variante está localizada en el sitio aceptor del intrón 3, lo que provoca la omisión del exón 3. Como resultado, se produce un cambio en el marco de lectura que introduce un codón de parada prematuro en la proteína (119).

La variante patogénica c.319+2T>C, recientemente descrita en una cohorte de pacientes chilenos con fenotipos clásicos, se localiza en el sitio de empalme del exón 3 y el intrón 3 del gen *GALNS*, afectando el sitio donante. Los análisis *in silico*, realizados en investigaciones previas, predijeron el uso de un sitio de empalme alternativo en el intrón

3, lo que resultaría en la inclusión de 271 nucleótidos adicionales en el transcrito de ARN y la introducción de un codón de terminación prematuro (p.A107Gfs\*53), afectando así la funcionalidad de la proteína (98).

Sin embargo, en este estudio se amplificó por PCR el transcrito canónico del gen *GALNS* en una paciente heterocigota compuesta para c.319+2T>C y p.G301C, con fenotipo clásico. Contrario a lo esperado, nuestros resultados revelaron dos productos de amplificación: uno de tamaño normal y otro de menor tamaño, aproximadamente 70-80 nucleótidos más corto que el de referencia, como se muestra en la Figura 6. Este transcrito aberrante corresponde con un salto parcial del exón 4, lo que llevaría a la inserción un codón de parada prematuro y a la pérdida de función enzimática (datos no publicados).

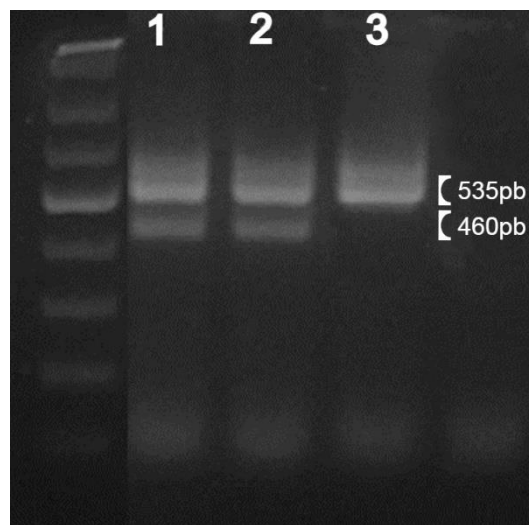


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa transcrito canónico del gen *GALNS*.  
En la electroforesis se observa: marcador de peso molecular, líneas 1-2: paciente; línea 3: control

Otra variante de interés es c.647\_648delinsCCT (p.F216Sfs3), encontrada en una paciente heterocigota compuesta para p.G301C, con fenotipo clásico, que no había sido reportada en la literatura. Esta variante provoca un cambio en el marco de lectura que genera un codón de terminación prematuro, resultando una proteína truncada de solo 219 aminoácidos que carece del dominio catalítico funcional, lo cual se correlaciona con la severidad del fenotipo clínico de la paciente (120). Esta variante se clasificó, de acuerdo con las Normas y directrices para la interpretación de variantes de secuencias del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)(121), como una variante patogénica.

Por otro lado, la variante patogénica p.S80L ha sido reportada previamente en pacientes con formas clásicas de MPS IVA en el Reino Unido y Colombia (122,123). Este cambio altera la estructura y función del dominio N-terminal de la sulfatasa. Los estudios *in silico* predicen un impacto deletéreo en la función de la enzima, lo cual es respaldado por datos

experimentales que demuestran una actividad enzimática reducida a menos del 10% en comparación con niveles normales, lo que respalda su clasificación como patogénica (100,123).

La variante patogénica p.G333D fue reportada por primera vez en dos hermanos colombianos con fenotipos severos de la enfermedad (124). Esta variante provoca un cambio altamente deletéreo, al sustituir una glicina neutra y flexible por un ácido aspártico más grande y cargado negativamente, en el dominio catalítico de la enzima. Este cambio altera las propiedades estructurales y de interacción de la proteína, impactando significativamente la actividad enzimática (125).

La variante patogénica p.W325X ha sido previamente reportada en pacientes colombianos y chinos con fenotipos severos de MPS IVA (126,127). Esta mutación introduce un codón de parada prematuro en el aminoácido 325 de la proteína, lo que produce una enzima truncada que carece del dominio catalítico. Esta alteración provoca una pérdida completa de la actividad enzimática, lo cual se corresponde con el fenotipo clínico de los pacientes reportados (126,127).

Finalmente, se identificó la variante p.L67M, clasificada como benigna, en un paciente heterocigoto compuesto, en *cis* con la variante patogénica p.G301C. Este polimorfismo ha sido reportado en estudios previos en pacientes con MPS IVA de los Países Bajos e Italia y también ha sido detectado en personas sanas, con una frecuencia alélica variable entre poblaciones. En la población europea, la frecuencia del alelo alternativo es baja (0.15%), mientras que en algunas poblaciones africanas puede alcanzar hasta un 34%. La amplia distribución de esta variante en individuos sanos refuerza su clasificación como benigna, sin impacto en el fenotipo clínico de los pacientes (122,128,129)

## **CAPÍTULO II: Construcción de haplotipos del gen *GALNS* en pacientes colombianos con MPS IV**

### **2.1. METODOLOGÍA**

#### ***Construcción de haplotipos por secuenciación de genoma completo***

##### *Secuenciación del genoma completo*

Aunque se disponía de datos de seis SNPs intragénicos previamente genotipificados, se decidió realizar la secuenciación de genoma completo (WGS) para obtener un panorama más detallado de la estructura haplotípica de los pacientes, permitiendo así la identificación de variantes adicionales en desequilibrio de ligamiento. Para ello, se seleccionaron las muestras de ADN de los pacientes que cumplieron los parámetros de calidad requeridos (pureza, concentración y ausencia de fragmentación) y se enviaron a un laboratorio externo para su secuenciación.

La WGS se realizó en la plataforma DNBSEQ-T7 (MGI Tech Co., Ltd., Shenzhen, China) mediante la tecnología paired-end de MGI, generando lecturas cortas de aproximadamente 100 pb con una profundidad mínima de 20X, suficiente para cubrir las regiones génicas de interés.

##### *Preprocesamiento de los datos de secuenciación*

Se llevó a cabo una evaluación inicial de la calidad de los archivos FASTQ utilizando la herramienta FASTQC (Babraham Bioinformatics), enfocándose en aspectos fundamentales como la calidad por base, los puntajes de calidad general, el contenido de GC y de nucleótidos, la distribución de la longitud de las lecturas, el nivel de duplicación, la sobre-representación de secuencias, así como la presencia de nucleótidos ambiguos y adaptadores (130). Para obtener una visualización integrada de los resultados individuales, se empleó la herramienta MultiQC (131).

Posteriormente, se realizó un proceso de filtrado utilizando la herramienta Fastp (132), con parámetros establecidos para una longitud mínima de 70 nucleótidos, una calidad promedio mínima de 25, y un recorte de los primeros 7 nucleótidos de cada lectura. La calidad de las lecturas filtradas fue reevaluada mediante FASTQC y los resultados consolidados nuevamente con MultiQC para garantizar la calidad de los datos filtrados.

##### *Alineamiento*

Las lecturas fueron alineadas de acuerdo con el genoma de referencia humano GRCh38, (GCA\_000001405.15\_GRCh38\_no\_alt\_analysis\_set.fna) empleando el algoritmo BWA-MEM (133). La calidad del alineamiento fue evaluada con Qualimap 2 (134), generando métricas de alineación y cobertura.

#### *Llamado de variantes*

Los archivos .bam generados tras el alineamiento fueron procesados empleando algunas herramientas del paquete Picard (135). Inicialmente, las lecturas fueron ordenadas mediante el comando SortSam y, después, se identificaron y eliminaron las lecturas duplicadas utilizando MarkDuplicates. Finalmente, se añadió la información de los grupos de lecturas utilizando la función AddOrReplaceReadGroups.

La recalibración de la calidad de las bases se realizó mediante el software GATK (v4.6.0.0)(136), utilizando los módulos BaseRecalibrator y ApplyBQSR. Finalmente, se utilizó el HaplotypeCaller para generar los archivos VCF con las variantes identificadas en cada uno de los individuos. Utilizando la herramienta bcftools, se filtraron los archivos para incluir exclusivamente los SNPs de todo el genoma. Para evaluar y visualizar la calidad de los VCF resultantes, se emplearon las bibliotecas pandas y matplotlib.

#### *Construcción de haplotipos*

Para filtrar exclusivamente los SNPs del gen *GALNS*, se utilizó la herramienta BCFtools (137), y se extrajeron las posiciones variantes en cada uno de los archivos VCF. Todos los SNPs intragénicos identificados fueron organizados en un archivo FASTA que contenía los genotipos de cada individuo.

El archivo FASTA fue cargado en DNA Sequence Polymorphism software (DnaSP v6) (138) para la identificación y reconstrucción de haplotipos.

Los haplotipos generados en DnaSP fueron exportados en un formato compatible con GenePop para su posterior análisis. Se analizaron tres grupos de pacientes que se definieron de acuerdo con el estado de portador de la variante G301C: (i) homocigotos para la variante p.G301C, (ii) heterocigotos compuestos (portadores de la variante p.G301C en combinación con otra variante del gen *GALNS*), y (iii) un grupo de no portadores de la variante.

Para el análisis de los haplotipos y la estructura genética de los pacientes, se utilizó el software POPART (Population Analysis with Reticulate Trees). Las redes de haplotipos fueron construidas con el test TSC (Tajima's Standardized Test), que evalúa la variabilidad

genética y la distribución de las frecuencias alélicas para cada grupo. Esto permitió determinar si existía algún patrón de diferenciación genética entre los grupos de homocigotos, heterocigotos y no portadores.

#### *Comparación de haplotipos en poblaciones de referencia*

Para la comparación de haplotipos, se seleccionaron los genomas de 13 pacientes homocigotos para la mutación p.G301C. Como referencia, se utilizaron datos de poblaciones latinas del proyecto 1000 Genomas, con 95 individuos CLM (Colombianos en Medellín) y 64 MXL (Mexicanos en Los Ángeles), para un total de 172 individuos.

Para las poblaciones africanas, se seleccionaron aleatoriamente 50 individuos de las subpoblaciones YRI (Yoruba en Ibadan, Nigeria) y ESN (Esan en Nigeria), completando un total de 100 individuos. De manera similar, se incluyeron 50 individuos de las subpoblaciones asiáticas CDX (Chinos Dai en Xishuangbanna) y CHB (Chinos Han en Beijing), sumando así 100 individuos para Asia. Finalmente, se seleccionaron 50 individuos de la subpoblación CEU (Europeos del Centro de Utah) y 50 de la subpoblación IBS (Ibéricos en España), completando 100 individuos para Europa.

Los análisis comparativos de haplotipos se realizaron de acuerdo con el protocolo bioinformático previamente descrito. Las redes de haplotipos se construyeron en PopArt, utilizando el algoritmo de Minimum Spanning Network (MSN) que permite representar las relaciones entre los haplotipos mediante una red de conexiones mínimas. Para simplificar la red y focalizarse en las relaciones filogenéticas más directas, se estableció un valor de epsilon de 1, restringiendo las conexiones a las más cortas posibles. Este ajuste facilitó la visualización de la red y la interpretación de los patrones de agrupación y proximidad entre haplotipos.

#### *Análisis estadísticos poblacionales*

Se utilizó el programa DnaSP (138) para estimar las frecuencias haplotípicas en una muestra que incluyó 15 genomas representativos de cada una de las poblaciones ancestrales (MXL, CLM, YRI, ESN, CDX, CHB, IBS y CEU) y 13 genomas de pacientes homocigotos para la variante p.G301C. DnaSP permitió la inferencia de haplotipos a partir de los datos genotípicos, los cuales fueron utilizados en análisis posteriores.

Además, se evaluó el desequilibrio de ligamiento (LD) en los haplotipos generados, comparando los resultados obtenidos para el conjunto de datos completo (poblaciones ancestrales) y para el conjunto restringido a los pacientes homocigotos.

En el análisis de LD, se calcularon diferentes estadísticos para caracterizar la estructura genética:

- ZnS (Kelly, 1997): para medir el promedio de correlación de LD entre todas las combinaciones de sitios polimórficos en la región del haplotipo de interés; valores más altos indicaron una mayor asociación entre variantes.
- Za (Rozas et al., 2001): para evaluar la correlación entre pares de sitios polimórficos e identificar bloques de LD.
- ZZ (Rozas et al., 2001): para representar la medida acumulativa del LD en todo el haplotipo; valores negativos sugirieron una falta de acumulación de LD en la región analizada.
- Wall's B y Wall's Q: para evaluar la probabilidad de recombinación en la región del haplotipo; valores altos indicaron una baja frecuencia de recombinación.

Como parte del análisis, se calcularon regresiones lineales de LD ( $r^2$ ,  $|D|$ ,  $|D'|$ ), representando la disminución de la correlación entre variantes con la distancia genética (X). En cada regresión, se evaluó el intercepto inicial y la pendiente, ya que el intercepto indica la fuerza del LD en sitios cercanos, mientras que la pendiente refleja la rapidez con la que disminuye el LD con la distancia.

Posteriormente, los haplotipos faseados fueron sometidos a un análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el software Arlequin v3.5.2 (139). Este análisis permitió evaluar la estructura genética, particionando la varianza molecular tanto dentro como entre los grupos y calculando los estadísticos F ( $F_{ST}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$ ).

#### *Estimación de la edad mutacional*

Para estimar la edad aproximada de la mutación G301C, se seleccionaron individuos homocigotos para la variante objetivo a partir de un archivo genómico faseado (VCF), empleando el software EstiAge (140), que calcula el tiempo transcurrido desde la aparición de una mutación en función de los haplotipos compartidos y las tasas de recombinación (141).

La región del haplotipo conservado fue delimitada identificando variantes flanqueantes aguas arriba y aguas abajo del marcador objetivo, y su tamaño se calculó como la distancia física entre las posiciones límite en megabases (Mb). Para estimar la edad mutacional en años, se utilizó un modelo basado en coalescencia según el enfoque descrito por Hudson et al. (142), empleando el tamaño del haplotipo conservado y una tasa de recombinación derivada de mapas genéticos de referencia, como HapMap (143).

El número de generaciones desde el ancestro común más reciente (MRCA) se convirtió a años asumiendo una tasa generacional estándar de 25 años por generación, junto con una tasa de recombinación constante de  $1 \times 10^8$  eventos por base por generación.

### ***Evaluación de haplotipos reportados en GALNS***

Dado que los estudios sobre efectos fundadores en la MPS IVA se han basado en la identificación de seis SNPs intragénicos en el gen *GALNS* (Tabla 4), se extrajo la información de estas posiciones en los genomas de los pacientes para comparar los haplotipos obtenidos con los previamente reportados a nivel internacional internacional (144–147). En los casos donde no se disponía de datos genómicos (9 pacientes), los SNPs fueron evaluados mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando sondas de tipo TaqMan para la genotipificación.

*Tabla 4. Lista de polimorfismos para haplotipos del gen GALNS*

| <b>dbSNP</b> | <b>Exón/Intrón</b> | <b>Posición cDNA</b> | <b>Genotipo</b> |
|--------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| rs3784883    | Intrón 5           | 621+134A/G           | G:A A:a         |
| rs1064315    | Exón 7             | 763T/C               | C:B T:b         |
| rs11076721   | Intrón 7           | 814-90A/T            | T:H A:h         |
| rs2303269    | Exón 11            | 1232G/T              | T:C G:c         |
| rs2303271    | Exón 13            | 1486A/G              | A:D G:d         |
| rs11076715   | Exón 14            | 1660A/G              | A:E G:e         |

Para cada sitio polimórfico, se diseñaron dos cebadores y dos sondas para detectar los alelos de interés. Las sondas dirigidas al alelo de referencia se marcaron en el extremo 5' con el fluorocromo FAM, mientras que las sondas correspondientes al alelo alternativo se marcaron con el fluorocromo JOE. Todas las sondas incluyeron un quencher BHQ-1 en su extremo 3', y fueron sintetizadas por MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea).

Las reacciones de genotipificación se realizaron utilizando el reactivo TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 µL, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por 2 minutos para la activación de la uracil-N-glucosilasa (UNG), seguido de 95°C por 20 segundos para la activación enzimática inicial. Posteriormente, se realizaron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 3 segundos y extensión a temperaturas que oscilaron entre 58°C y 62°C, para cada par de cebadores. Los resultados de genotipificación se analizaron utilizando el software 7500 SDS v1.5.1, donde se

determinaron los genotipos mediante la interpretación de los umbrales de fluorescencia para cada fluorocromo.

### *Comparación con datos poblacionales*

Para la comparación de los haplotipos obtenidos en los pacientes con datos de poblaciones ancestrales, se extrajeron las posiciones correspondientes a seis SNPs intragénicos del gen *GALNS* de los datos disponibles en 1000 genomas. Estas posiciones se obtuvieron a partir del archivo VCF que contenía los datos genotípicos ya faseados de las siguientes poblaciones: CLM (n=95), MXL (n=64), IBS (n=107), CEU (n=99), CDX (n=100), CHB (n=106), YRI (n=107) y ESN (n=107), para un total de 785 individuos.

## **2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Construcción de haplotipos por secuenciación de genoma completo***

De los 35 pacientes incluidos en el estudio, 9 no fueron procesados mediante secuenciación de genoma completo debido a que el ADN no cumplía con los criterios de calidad establecidos. Se analizaron 26 genomas de individuos afectados, a partir de los cuales se extrajeron únicamente los SNPs para los análisis subsecuentes.

### *Preprocesamiento de los datos de secuenciación*

Los archivos individuales FASTQ fueron analizados inicialmente con la herramienta FastQC para evaluar la calidad de las secuencias, y los resultados fueron compilados utilizando MultiQC para facilitar la interpretación global de las métricas. Los datos muestran un bajo porcentaje de duplicados (8-12%), lo que sugiere una buena cobertura de secuencias únicas. Además, la mayoría de las secuencias presentan puntuaciones altas en la escala de Phred (Figura 7), lo que indica una alta calidad en las lecturas. Sin embargo, se observa una notable variabilidad en el número de secuencias por muestra (226.5-441.8 millones), lo cual representa una limitación en términos de uniformidad de la profundidad de cobertura entre las muestras.

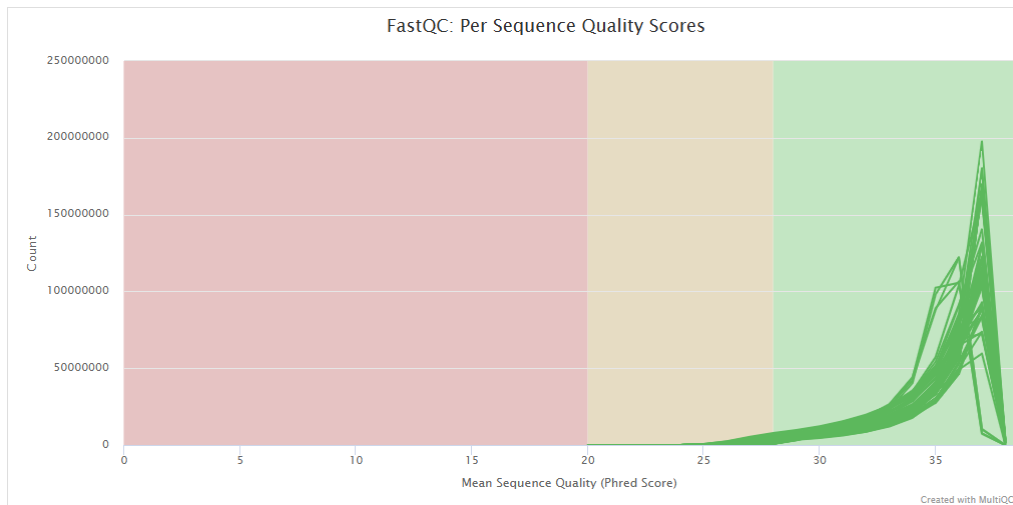


Figura 7. Escala Phred por número de secuencias (MultiQC)

## Alineamiento

El alineamiento de las lecturas se realizó utilizando el algoritmo BWA-MEM, obteniendo un total de 15,522,391,434 lecturas mapeadas. La cobertura promedio de las muestras fue de 17.93X, mientras que la cobertura fraccional del genoma (Figura 8) muestra que la mayoría de las muestras presentan una alta fracción del genoma cubierta de al menos 10X, un valor generalmente considerado adecuado para el análisis de variantes en estudios genómicos de alta precisión. El contenido promedio de GC fue de 41.02%, lo cual concuerda con los valores esperados en genomas humanos. En conjunto, estos parámetros respaldan la calidad de los datos.

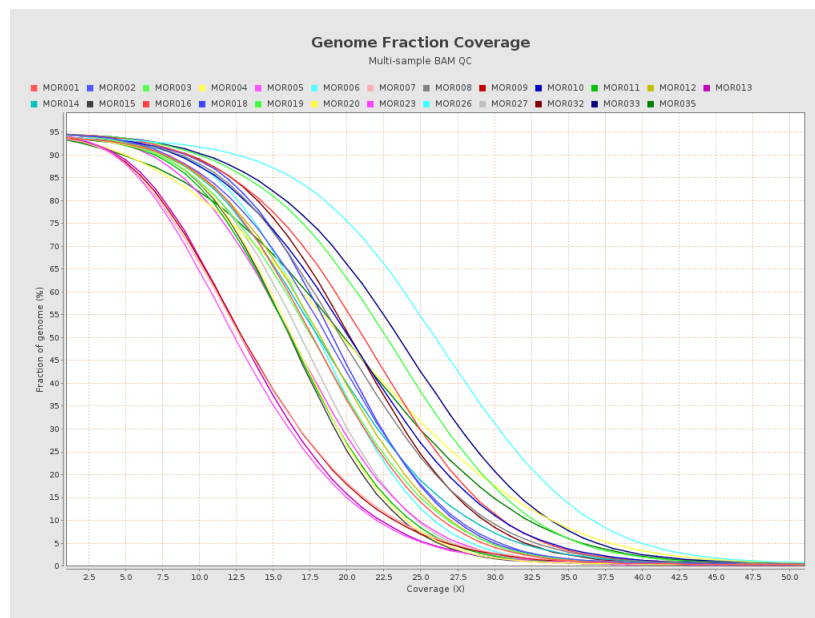


Figura 8. Cobertura fraccional de los genomas

## Llamado de variantes

Se realizó el llamado de variantes utilizando las herramientas de GATK, y posteriormente se filtraron exclusivamente los SNPs de los cromosomas 1 al 22 mediante bcftools. Para evaluar y visualizar la calidad de los VCF resultantes, se emplearon las bibliotecas pandas y matplotlib, generando gráficos de la profundidad promedio (DP) de las variantes, como se muestra en la Figura 9.

El promedio general de DP en todas las muestras y cromosomas fue de 15X. El cromosoma 15 presentó la mayor profundidad promedio, alcanzando 20X, seguido por los cromosomas 20 y 21, con profundidades de 19X y 17X, respectivamente. En contraste, los cromosomas con menor DP fueron el cromosoma 8 (10X) y los cromosomas 6 y 11, (11X). Cabe destacar que para el cromosoma 16, donde se localiza el gen *GALNS*, la profundidad promedio fue de 20X, lo cual resultó favorable para la construcción de haplotipos en este gen.

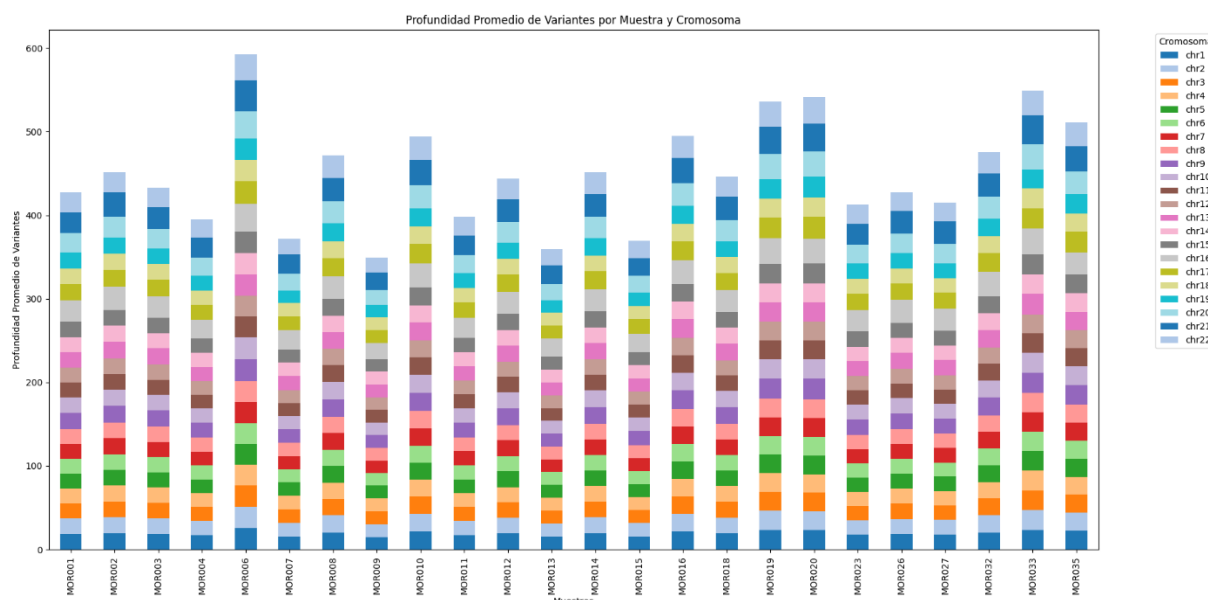


Figura 9. Profundidad promedio de variantes por muestra y cromosoma

## Construcción de haplotipos

Utilizando la herramienta DnaSP, se definieron tres grupos de acuerdo con el estado de portador de la variante p.G301C: homocigotos, heterocigotos compuestos, y un tercer grupo compuesto por pacientes que no portaban la variante (otros). Se obtuvieron 35 haplotipos, destacándose el haplotipo 5 que incluyó 18 secuencias (n=70). Los resultados obtenidos demuestran que la mayoría de pacientes homocigotos para la variante G301C

compartían el mismo haplotipo, como se muestra en la Figura 10. Esto sugiere un posible efecto fundador en la población homocigota, dado que el haplotipo predominante en estos pacientes podría haber sido transmitido por un ancestro común portador de la variante. Además, los pacientes heterocigotos compuestos presentaron una mayor diversidad de haplotipos, distribuidos a lo largo de la red, lo que podría indicar una mayor variabilidad genética en este grupo.

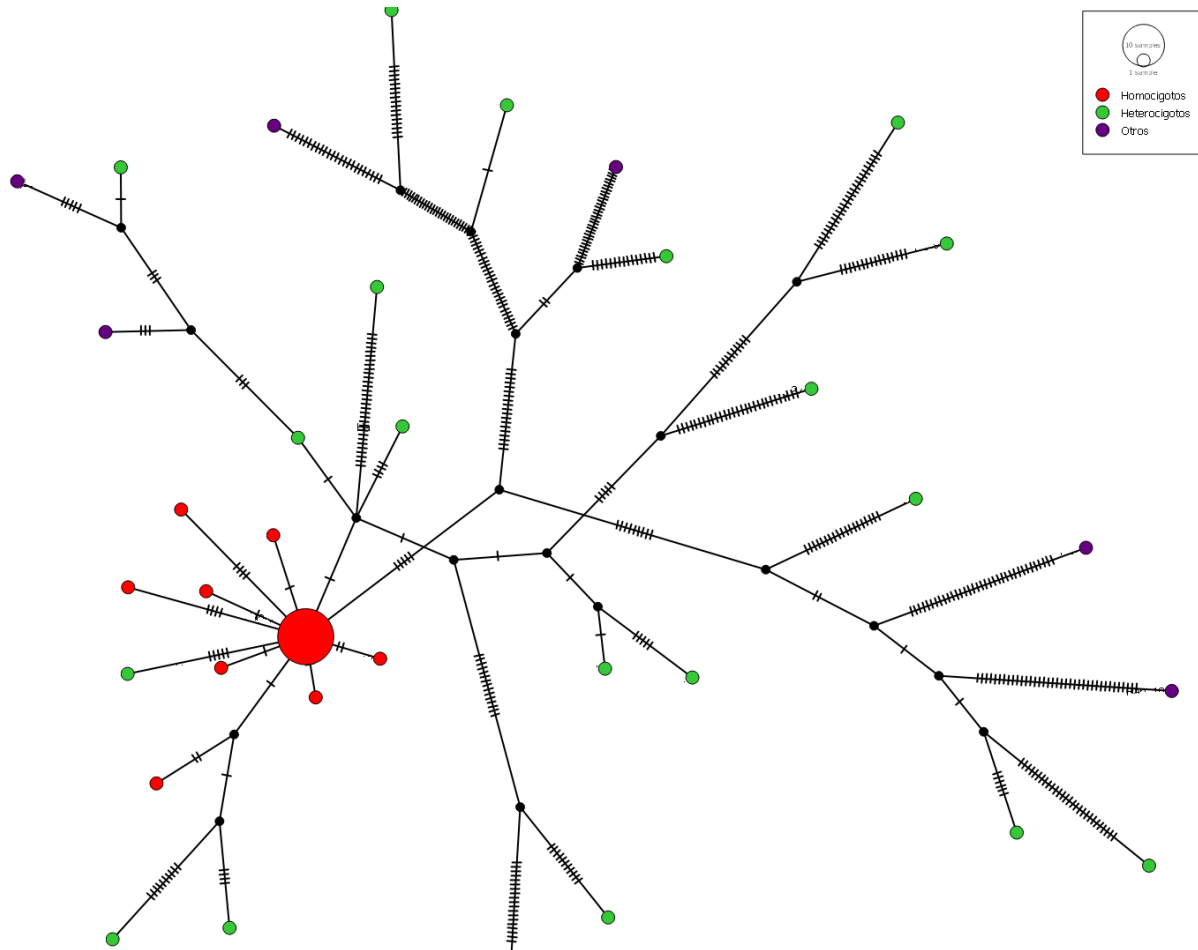


Figura 10. Red de haplotipos de pacientes con MPS IVA

Los análisis de diversidad genética en toda la cohorte demostraron una diversidad nucleotídica de  $\pi = 0.000611918$ , indicando una baja variación en el locus *GALNS* entre los individuos estudiados. Se identificaron 227 sitios segregantes y 144 sitios informativos para parsimonia, los cuales permiten evaluar las diferencias genéticas relevantes entre los haplotipos. El valor de Tajima's D fue  $D = -1.70481$ , con un p-valor de 0.966131, lo cual sugiere un exceso de variantes raras en la población y es consistente con un efecto fundador.

La distribución geográfica de todos los haplotipos de la cohorte se muestra en la Figura 11. La presencia del haplotipo común (Hap\_19) en diversas localidades del eje cafetero, coincide con el patrón de migración y colonización antioqueña, un fenómeno histórico que comenzó a mediados del siglo XIX y continuó hasta principios del siglo XX. Durante este período, pobladores de Antioquia se desplazaron hacia el sur y suroeste del país en busca de nuevas tierras para el cultivo, especialmente de café, y mejores oportunidades económicas (148). Esta migración impulsó el asentamiento en lo que hoy se conoce como el Eje Cafetero, que abarca los departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío, así como el norte del Valle del Cauca y parte de Tolima (149).

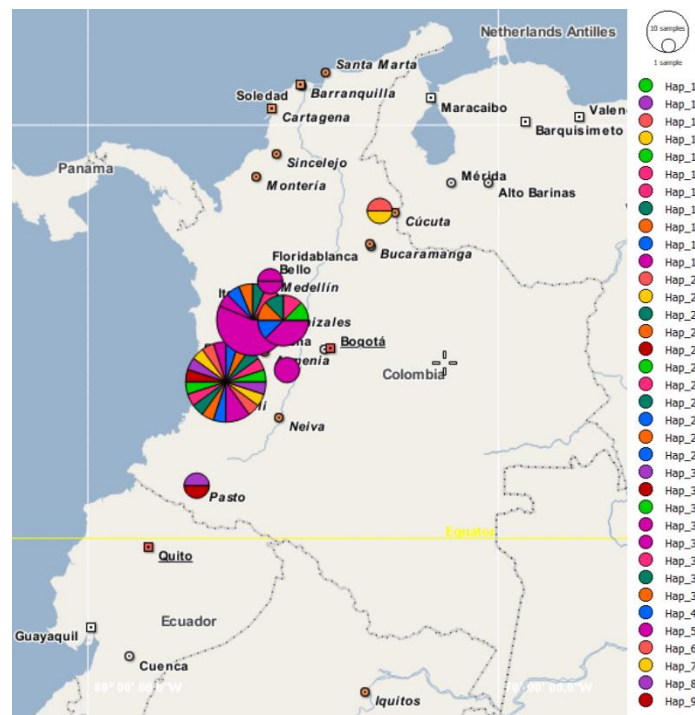


Figura 11. Distribución geográfica de haplotipos de pacientes colombianos con MPS IVA

Estos hallazgos sugieren que los colonos antioqueños llevaron consigo variantes genéticas, como la mutación p.G301C, a las regiones hacia donde migraron. La dispersión de esta mutación en diversas localidades del país respalda la hipótesis de un efecto fundador, lo que explicaría su alta frecuencia en la población colombiana actual, especialmente en el Eje Cafetero y otras zonas influenciadas por la migración antioqueña (148).

Al realizar el análisis de haplotipos exclusivamente con los homocigotos para la variante p.G301C, los resultados indicaron una diversidad aún menor, con una diversidad nucleotídica de  $\pi = 3.02608e-05$ . En este grupo, solo se identificaron 17 sitios segregantes y ningún sitio informativo para parsimonia, reflejando una notable homogeneidad genética. Además, el valor de Tajima's D fue  $D = -2.48926$ , con un p-valor de 0.999632, lo

cual refuerza la hipótesis de un efecto fundador, ya que indica una marcada reducción en la variabilidad genética, consistente con un origen común de estos individuos. La red de haplotipos homocigotos se muestra en la Figura 12.

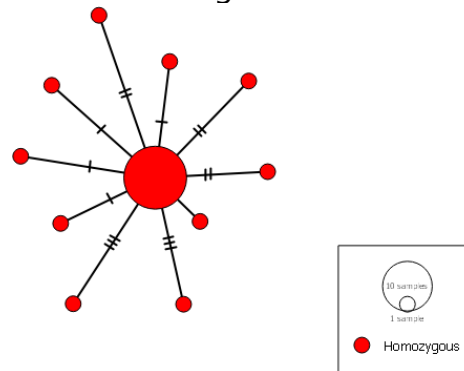


Figura 12. Red de haplotipos de pacientes homocigotos para G301C

### Comparación de haplotipos en poblaciones de referencia

La red de haplotipos en poblaciones latinoamericanas, que incluyó a 172 individuos y generó un total de 328 haplotipos, destaca un haplotipo común que agrupa 16 alelos provenientes de los pacientes homocigotos, como se ilustra en la Figura 13A (Para figura ampliada ver ANEXO 4: REDES DE HAPLOTIPOS). Esta red muestra una estructura densa y altamente interconectada entre los haplotipos de los individuos homocigotos para la mutación p.G301C y las poblaciones de referencia latinas (CLM y MXL). Estos hallazgos sugieren que la mutación p.G301C se propagó desde un ancestro común, lo cual respalda la hipótesis de un efecto fundador de esta variante en la población colombiana.

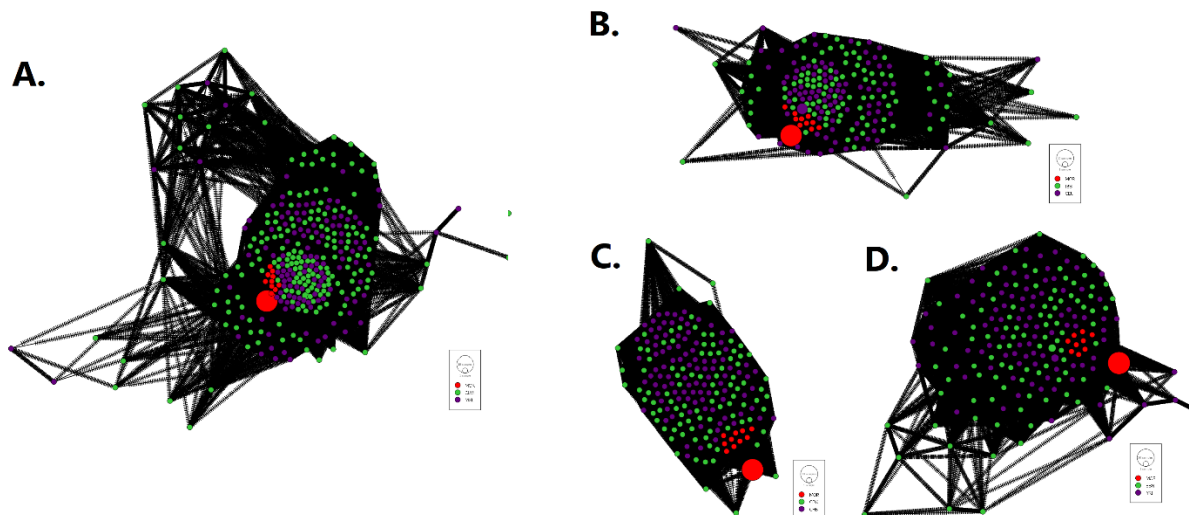


Figura 13. Redes de haplotipos en poblaciones ancestrales del gen GALNS

A. Red latinoamericana: haplotipos MOR (rojo), CLM (verde), MXL (morado). B. Red europea: haplotipos MOR (rojo), IBS (verde), CEU (morado). C. Red asiática: haplotipos MOR (rojo), CDX (verde), CHB (morado). D. Red africana: haplotipos MOR (rojo), ESN (verde), YRI (morado).

La red de haplotipos con las poblaciones europeas de referencia (IBS y CEU) muestra que los individuos MOR se agrupan en proximidad a los haplotipos europeos, particularmente a los del grupo IBS. Sin embargo, el haplotipo común G301C presenta menor frecuencia y una mayor dispersión en esta red en comparación con la red latinoamericana. Esta mayor diversidad haplotípica sugiere una relación genética menos estrecha con el nodo central, lo cual podría reflejar un flujo genético histórico. Por lo anterior, la variante G301C podría haber llegado a Europa a través de migraciones recientes o compartidas y no como una mutación originaria de esta población.

Finalmente, en las redes correspondientes a las poblaciones africanas y asiáticas, el haplotipo común G301C aparece de forma esporádica y sin formar un nodo dominante. En ambas poblaciones se observa una amplia diversidad haplotípica, lo que sugiere que la mutación p.G301C no es común en estas poblaciones ancestrales.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de un probable origen latinoamericano de la mutación p.G301C, evidenciando un efecto fundador en la población colombiana. La estructura centralizada y la alta frecuencia del haplotipo común en estas redes sugieren la expansión de un ancestro compartido. En contraste, la dispersión y baja frecuencia de p.G301C en las poblaciones de Europa, África y Asia apuntan a una introducción reciente desde América Latina (118,150)

#### *Análisis estadísticos poblacionales*

En el análisis global que incluyó a todas las poblaciones ancestrales (CLM, MXL, MOR, IBS, CEU, CDX, CHB, YRI y ESN), se observaron valores bajos de desequilibrio de ligamiento (LD) globales, con un ZnS de 0.0222 y un Za de 0.0496, reflejando una correlación moderada entre variantes. Sin embargo, cuando se restringió el análisis a los haplotipos de pacientes homocigotos para la variante G301C, los valores de LD fueron significativamente más altos, con un ZnS de 0.0755 y un Za de 0.0719 (Tabla 5. Comparación de estadísticos del desequilibrio de ligamiento para los haplotipos Tabla 5).

*Tabla 5. Comparación de estadísticos del desequilibrio de ligamiento para los haplotipos*

| <b>Estadístico</b>      | <b>Análisis global</b> | <b>Análisis homocigotos G301C</b> |
|-------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| ZnS (Kelly, 1997)       | 0.0222                 | 0.0755                            |
| Za (Rozas et al., 2001) | 0.0496                 | 0.0719                            |
| ZZ (Rozas et al., 2001) | 0.0274                 | -0.0036                           |
| Wall's B                | 0.0020                 | 0.0625                            |
| Wall's Q                | 0.0039                 | 0.1176                            |

|                              |         |         |
|------------------------------|---------|---------|
| Regresión $r^2$ (Intercepto) | 0.0311  | 0.1050  |
| Regresión $r^2$ (Pendiente)  | -0.0006 | -0.0018 |

Los estadísticos de Wall (B y Q) también fueron notablemente mayores en los homocigotos, indicando una ausencia significativa de recombinación en esta población.

En el análisis global, el intercepto inicial de  $r^2$  fue bajo (0.0311), indicando una correlación moderada entre variantes en sitios cercanos. La pendiente de -0.0006 refleja una disminución lenta del LD con la distancia, lo cual es típico de poblaciones diversas con mayor recombinación histórica. Por el contrario, en los pacientes homocigotos, el intercepto inicial fue mucho más alto (0.1050), indicando un LD fuerte en sitios cercanos, mientras que la pendiente de -0.0018 muestra una disminución más pronunciada, sugiriendo bloques haplotípicos más cortos.

Por otro lado, el estadístico ZZ fue negativo (-0.0036) en los homocigotos, a diferencia del análisis global (0.0274), lo cual sugiere que no hay acumulación significativa de desequilibrio de ligamiento en toda la región, probablemente debido al bajo número de polimorfismos analizados en los homocigotos.

Estos hallazgos demuestran que los pacientes homocigotos para la variante p.G301C presentan un bloque haplotípico altamente conservado y con un desequilibrio de ligamiento más fuerte que el observado en las poblaciones ancestrales. Este patrón es consistente con la presencia de un efecto fundador, un evento demográfico en el cual un cuello de botella poblacional reduce la diversidad genética y conserva bloques haplotípicos en la población derivada (66,67).

En cuanto al AMOVA, los análisis se realizaron considerando cinco grupos poblacionales: un grupo conformado exclusivamente por los pacientes homocigotos para G301C, un segundo grupo que incluyó las dos poblaciones latinas (CLM y MXL), un tercer grupo con poblaciones asiáticas (CDX y CHB), un cuarto grupo con poblaciones europeas (CEU e IBS) y un quinto grupo con poblaciones africanas (YRI y ESN). Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 6.

Este análisis reveló que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones individuales, representando el 87.89% de la variación total, con un componente de varianza de 32.15175 ( $P < 0.00001$ ), lo que indica que las diferencias genéticas dentro de las poblaciones son significativas y predominantes. En contraste, solo el 11.82% de la variación genética total puede explicarse por diferencias entre los grupos principales definidos ( $V_a = 4.32314$ ), un resultado estadísticamente significativo ( $P =$

0.00391  $\pm$  0.00185), lo que evidencia una diferenciación moderada entre los grupos (FCT = 0.11818).

Por otro lado, las diferencias genéticas entre las poblaciones dentro de cada grupo fueron mínimas, explicando solo el 0.29% de la variación total, con un componente de varianza de 0.10644 (P = 0.43988  $\pm$  0.01680), lo que refleja una alta similitud genética entre poblaciones que comparten un mismo grupo.

*Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y pruebas de significancia*

| Fuente de variación                     | d.f* | Componentes de varianza | Porcentaje de variación | Índice de Fijación | Pruebas de Significancia (P-valor) |
|-----------------------------------------|------|-------------------------|-------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Entre grupos (Va)                       | 4    | 4,3231                  | 11,82%                  | FCT:<br>0,11818    | 0.00391 $\pm$ 0.00185              |
| Entre poblaciones dentro de grupos (Vb) | 4    | 0,1064                  | 0,29%                   | FSC:<br>0,00330    | 0.43988 $\pm$ 0.01680              |
| Dentro de las poblaciones (Vc)          | 255  | 32,1518                 | 87,89%                  | FST:<br>0,12109    | 0.00000 $\pm$ 0.00000              |
| <b>Total</b>                            | 263  | 36,5813                 | 100%                    | -                  | -                                  |

\*d.f: grados de libertad

Los resultados del AMOVA respaldan la idea de que el grupo portador de la mutación p.G301C presenta una diferenciación genética significativa respecto a las demás poblaciones, explicando el 11.82% de la variación genética total entre los grupos. Este porcentaje relativamente alto indica que la cohorte homocigota para G301C está genéticamente diferenciada de los otros grupos principales (latino, asiático, europeo y africano), lo que es consistente con un evento fundador que habría aislado genéticamente a estos individuos y fijado la mutación dentro de esta población específica.

Pese a lo anterior, la mayor parte de la variación genética total (87.89%) se encuentra dentro de las poblaciones. Esto sugiere que, aunque los individuos homocigotos para G301C están claramente diferenciados de otros grupos, en las demás poblaciones, la diversidad genética es mayor, lo que contribuye significativamente a este valor elevado.

Finalmente, la baja diferenciación genética entre poblaciones dentro de los grupos (0.29%) indica que estas subpoblaciones comparten una alta similitud genética y no han

experimentado eventos de diferenciación genética drásticos, lo cual es comprensible, ya que los grupos estaban conformados por subpoblaciones del mismo continente.

En conjunto, estos resultados reafirman la hipótesis del efecto fundador, ya que los pacientes homocigotos para G301C presentan una diferenciación genética significativa respecto a las demás poblaciones ancestrales, como lo indica el porcentaje elevado de variación entre grupos y el LD fuerte observado en estos pacientes.

Este patrón es comparable a otras enfermedades raras asociadas a eventos fundadores, como las enfermedades de almacenamiento de lípidos en los judíos Ashkenazi (151), el síndrome de leiomiomatosis hereditaria y cáncer de células renales en Alicante, España (75), y la trombocitemia hereditaria en italianos (152). En estos casos, el rastreo del origen poblacional de las variantes genéticas permitió identificar los eventos históricos responsables de su fijación, así como entender cómo estos procesos contribuyeron a su prevalencia en las poblaciones actuales. De manera similar, los hallazgos en los pacientes homocigotos para G301C no solo enriquecen nuestra comprensión de las bases genéticas de esta variante, sino que también proporcionan un marco para desarrollar estrategias diagnósticas y terapéuticas más precisas, orientadas a mitigar su impacto en las poblaciones afectadas (79,86).

#### *Estimación de la edad mutacional*

La edad mutacional de la variante p.G301C se determinó utilizando el software EstiAge, empleando como entrada un archivo VCF faseado que contenía exclusivamente los datos genotípicos de los individuos homocigotos para esta variante (n=13).

Se identificó un haplotipo conservado en los 13 individuos homocigotos, compuesto por 11 variantes aguas arriba y 2 variantes aguas abajo del marcador objetivo (posición 16:88832099). Este haplotipo definió una región genómica flanqueada entre las posiciones 16:21187396 y 16:90093348, abarcando un total de aproximadamente 68.9 Mb.

La estimación de la edad mutacional se fundamentó en el cálculo del número de generaciones transcurridas desde el ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés), siguiendo el enfoque descrito por Hudson et al. (142) Este método se aplicó considerando el tamaño del haplotipo conservado y una tasa de recombinación de 1.12 cM/Mb, derivada de los datos de recombinación proporcionados por el proyecto HapMap (143). El análisis arrojó un estimado de 61.41 generaciones, y para convertir este dato a años, se asumió una tasa de 25 años por generación y una tasa de recombinación de

$1 \times 10^8$  eventos por base por generación, resultando en una edad aproximada de 1535 años.

En términos cronológicos, esta mutación habría surgido alrededor del año 489 d.C., ubicándola en el contexto histórico colombiano dentro del período prehispánico, anterior al inicio de la colonización española en el siglo XVI, lo cual sugiere que la mutación p.G301C probablemente se originó y se mantuvo en poblaciones indígenas colombianas (153).

Este hallazgo es consistente con registros arqueológicos, como las evidencias de condiciones genéticas representadas en las cerámicas de la cultura Tumaco-Tolita, donde se observan características físicas específicas, como macrocefalia, cifoescoliosis y tórax en forma de campana, que podrían corresponder a enfermedades genéticas como el síndrome de Morquio A. Además, el estatus jerárquico sugerido por los adornos presentes en las figuras indica un posible reconocimiento social hacia individuos con estas condiciones, lo que podría haber contribuido a la preservación y transmisión de la mutación (153).

### ***Evaluación de haplotipos reportados en GALNS***

Se evaluaron seis polimorfismos reportados previamente en la literatura, 26 pacientes fue obtenida la información por filtrado del VCF del genoma completo y 9 pacientes fueron obtenidos por genotipificación por qPCR a través de sondas tipo TaqMan. Los haplotipos obtenidos se describen en la Tabla 7.

*Tabla 7. Haplotipos por SNPs intragénicos en GALNS*

| <b>Código</b> | <b>Haplotipo 1</b> | <b>Haplotipo 2</b> | <b>Mutación 1</b> | <b>Mutación 2</b> |
|---------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| MOR-001       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | S80L              |
| MOR-002       | ABHcde             | abhCDe             | G301C             | R386C             |
| MOR-003       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | G301C             |
| MOR-004       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | 319+2             |
| MOR-005       | ABhcDe             | abhCDe             | R386C             | R386C             |
| MOR-006       | ABHcde             | abhCDE             | G301C             | F216Sfs*3         |
| MOR-007       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | G301C             |
| MOR-008       | ABHcde             | ABhcDe             | G301C             | R386C             |
| MOR-009       | ABHcde             | ABHcdE             | G301C             | 320-1             |
| MOR-010       | ABHcde             | abhCDE             | G301C             | R386C             |
| MOR-011       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | G301C             |
| MOR-012       | ABHcde             | ABHcde             | W325*             | R94C              |
| MOR-013       | ABHcde             | ABHcde             | G301C             | G301C             |

|         |        |        |       |       |
|---------|--------|--------|-------|-------|
| MOR-014 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-015 | ABHcde | ABHcde | G301C | W325* |
| MOR-016 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-017 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-018 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-019 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-020 | ABHcde | ABhcDe | G301C | G333D |
| MOR-021 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-022 | ABHcde | ABhcdE | G301C | R94C  |
| MOR-023 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-024 | ABHcde | abhcDe | G301C | R386C |
| MOR-025 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-026 | ABHcde | abhcDe | G301C | R386C |
| MOR-027 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-028 | ABHcde | ABhcdE | G301C | R94C  |
| MOR-029 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-030 | ABHcdE | ABHcdE | G301C | R386C |
| MOR-031 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-032 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-033 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |
| MOR-034 | ABHcde | ABhcDe | R94C  | G333D |
| MOR-035 | ABHcde | ABHcde | G301C | G301C |

En la población estudiada, el haplotipo más frecuente asociado a la mutación G301C fue ABHcde, encontrado en 31 de los 35 individuos evaluados (88.6%). Este haplotipo predominó tanto en individuos homocigotos para G301C (54.3%) como en heterocigotos compuestos (34.3%). Otros haplotipos identificados incluyen ABhcDe y abhcDe, observados en heterocigotos compuestos con frecuencias del 2.9% y 5.7%, respectivamente. De igual forma, el haplotipo ABhcdE estuvo presente en el 5.7% de los individuos, asociado exclusivamente a combinaciones heterocigotas con otras mutaciones patogénicas como R94C. En cuanto a los individuos con mutaciones distintas a G301C, se identificaron haplotipos menos frecuentes como ABHcdE, observado en un individuo portador de la mutación L67M.

Al comparar estos hallazgos con datos de otras poblaciones, se observan diferencias notables en los patrones haplotípicos. Por ejemplo, en Brasil, Bochernitsan et al. reportaron el haplotipo abHcDe como el más frecuente en pacientes homocigotos para G301C (96). En contraste, en nuestro estudio, ABHcde fue el haplotipo predominante, presente no solo en homocigotos para G301C sino también en heterocigotos compuestos para esta variante.

Por otra parte, en un estudio realizado en Túnez se encontró que el haplotipo más común en individuos control era abhcDE, mientras que en pacientes homocigotos para la mutación c.120+1G>A, el haplotipo exclusivo identificado fue ABHcde (95).

Estos datos sugieren que la construcción de haplotipos intragénicos en el gen *GALNS*, basada en los seis SNPs reportados en la literatura, puede no ser del todo adecuada para evaluar las asociaciones específicas entre haplotipos y mutaciones, ya que el haplotipo ABHcde, previamente asociado a la mutación c.120+1G>A, también resultó ser el más frecuente en nuestra cohorte de pacientes con G301C.

### *Comparación con datos poblacionales*

Con el fin de validar los resultados, se evaluaron los haplotipos de 8 poblaciones ancestrales, disponibles en 1000 genomas: europeos (IBS y CEU), asiáticos (CDX y CHB), africanos (YRI y ESN) y latinoamericanos (MXL y CLM). El haplotipo ABHcde fue el más frecuente (47%), con predominio en europeos, africanos y americanos, mientras que abhcDE (23%) fue más común en asiáticos (Figura 14). Estos hallazgos son consistentes con los reportados por Rezvi et al., quienes, al analizar poblaciones japonesas y caucásicas, identificaron patrones similares en la distribución de los haplotipos de personas sanas (154)

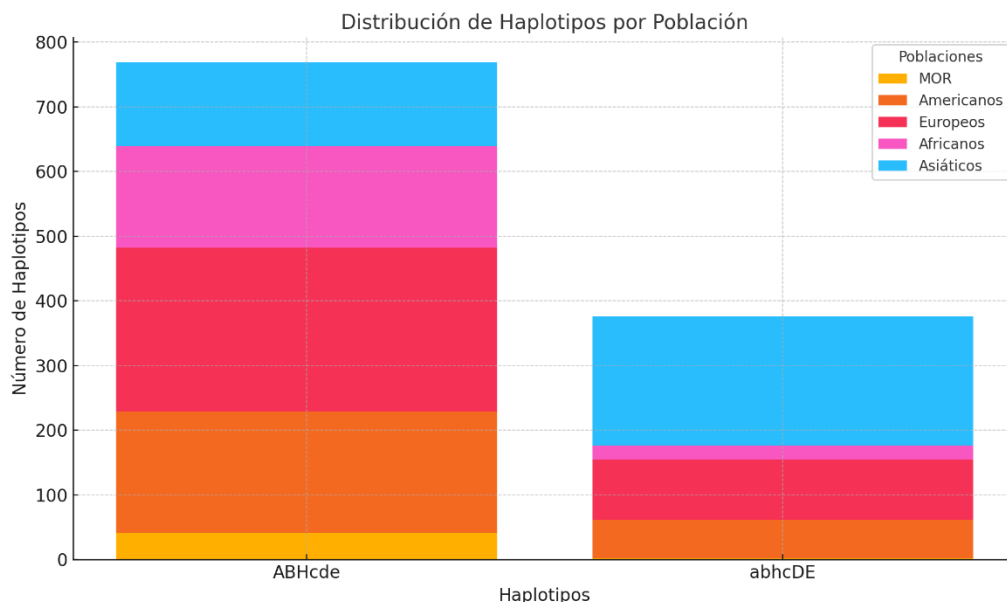


Figura 14. Distribución de haplotipos más frecuentes del gen *GALNS*

En las poblaciones latinoamericanas después de los haplotipos ABHcde y abhcDE, se encontró el haplotipo ABhCDe (7%) que se encontró con una frecuencia similar en población africana y en baja frecuencia en poblaciones europeas y asiáticas.

Sorprendentemente, los haplotipos reportados por Bochernitsan et al. en individuos sanos de Brasil no se identificaron en las poblaciones analizadas (96), lo que plantea interrogantes sobre la exactitud de los datos publicados. Una posible explicación radica en un error de interpretación en la codificación del SNP rs3784883, que representa el genotipo A/a. Según nuestros criterios, este SNP debería ser asignado como G:A;A:a, mientras que la publicación brasileña lo codifica incorrectamente como G:a;A:A.

Asimismo, se detecta una discrepancia en la identificación del SNP intrónico rs11076715, que corresponde al genotipo E/e, ya que el estudio brasileño lo asocia erróneamente con el rs749979032. Estas inconsistencias metodológicas llevaron a excluir dicha publicación del análisis de haplotipos en pacientes con MPS IVA. Este caso resalta la importancia de una asignación precisa y estandarizada de los genotipos, sugiriéndose que los nucleótidos sean representados mediante nucleótidos para evitar confusiones y garantizar la reproducibilidad de los estudios genéticos.

Finalmente, la construcción de haplotipos intragénicos basada en los seis SNPs reportados previamente en la literatura reveló un haplotipo predominante en los portadores de la mutación G301C. No obstante, la alta frecuencia de este haplotipo en diversas poblaciones de individuos sanos pone en duda la utilidad de estos marcadores para caracterizar las asociaciones haplotípicas. La comparación con datos de 1000 Genomas destacó la importancia de implementar enfoques metodológicos más robustos y estandarizados para mejorar la precisión y reproducibilidad de los estudios en genética poblacional.

## **CAPÍTULO III: ancestría genética global y local de individuos colombianos con MPS IVA**

### **3.1. METODOLOGÍA**

#### ***Análisis de ancestría global***

##### *Preparación de los datos*

Se utilizó el mismo protocolo bioinformático descrito previamente, desde el pre-procesamiento de los datos (archivos FASTQ) hasta el llamado de variantes. Para este último paso, se utilizó la función HaplotypeCaller en modo GVCF, llamando variantes por muestra y generando archivos GVCF intermedios conforme a las recomendaciones del protocolo *Germline Short Variant Discovery* (SNPs + Indels) de GATK. Posteriormente, los archivos GVCF se consolidaron mediante GenomicsDBImport, y se realizó la genotipificación conjunta utilizando GenotypeGVCFs. Finalmente, se utilizó la función SelectVariants de GATK para seleccionar los SNPs con una profundidad mayor a 10X, generando el conjunto de datos de los pacientes.

Para construir el conjunto de datos de la población control, se obtuvieron los datos de los SNPs de todos los autosomas (cromosomas 1 al 22) disponibles en el proyecto 1000 Genomas. Después, se filtraron únicamente los individuos correspondientes a seis poblaciones: Yoruba en Ibadan, Nigeria (YRI); Esan en Nigeria (ESN); Ibéricos en España (IBS); residentes de Utah con ascendencia europea occidental (CEU); Chinos Han en Beijing, China (CHB); Colombianos en Medellín (CLM); y Mexicanos en Los Ángeles, California (MXL).

A partir de los conjuntos de datos generados para pacientes y controles, se empleó *bcftools* para filtrar y extraer los sitios polimórficos en cada grupo. Posteriormente, se realizó una intersección de variantes utilizando la función *bcftools comm*, lo cual permitió identificar y extraer los SNPs presentes en ambos conjuntos de datos. Finalmente, los archivos resultantes de estas operaciones fueron combinados mediante *bcftools merge*, consolidando en un solo archivo los SNPs comunes para el análisis comparativo.

##### *Control de calidad de los datos*

Para asegurar la integridad de los datos, se realizó un control de calidad utilizando la herramienta PLINK (155). Inicialmente, se aplicaron filtros de calidad para eliminar SNPs

con tasas elevadas de genotipos faltantes, garantizando así la fiabilidad de los datos genéticos. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para verificar la distribución de las poblaciones analizadas. Este enfoque permitió confirmar la consistencia de las muestras en cada población, asegurando su idoneidad para los análisis posteriores.

### *Estadísticos F*

Utilizando el software FrAnTK (156), se realizaron análisis de los estadísticos F (F3, D y F4-ratio) con el fin de evaluar las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones, empleándolos como control de calidad adicional y para identificar patrones de ancestría compartida y posibles eventos de mezcla genética.

### *Estimación de la ancestría genética global*

Para estimar la ancestría global de las poblaciones, se utilizó el software ADMIXTURE (157), el cual implementa un modelo de mezcla genética basado en componentes ancestrales. Se ejecutaron análisis de ancestría con diferentes valores de K, representando posibles grupos ancestrales, para determinar la mejor estructura poblacional. Posteriormente, se seleccionó el valor de K óptimo utilizando el criterio de validación cruzada, permitiendo identificar las proporciones de ancestría de cada individuo en los distintos componentes ancestrales definidos.

### *Haplogrupos mitocondriales*

Para el análisis de haplotipos mitocondriales, se filtraron los SNPs del cromosoma mitocondrial (chrM) con una profundidad superior a 30X, garantizando la calidad y la confiabilidad de las variantes incluidas. Se utilizó Haplogrep 3, una herramienta diseñada para clasificar secuencias mitocondriales según la base de datos de referencia Phylotree (158). Las secuencias mitocondriales de cada paciente fueron cargadas en formato VCF y analizadas mediante la plataforma online <https://haplogrep.i-med.ac.at/>, permitiendo la asignación de haplogrupos para cada individuo.

### **Análisis de ancestría local**

Para llevar a cabo el análisis de ancestría local del cromosoma 16, se utilizó el software *Beagle* (159) para fasear los genotipos, lo que permitió mejorar la precisión en la asignación de segmentos ancestrales a lo largo del cromosoma. Este proceso se realizó empleando el mapa de recombinación correspondiente al cromosoma 16 en la referencia GRCh38.

Los análisis se realizaron teniendo en cuenta dos modelos de entrenamiento para el programa Gnomix 5.4 (160). En el primer modelo, se emplearon tres poblaciones ancestrales (Asia, Europa y África) para el entrenamiento, mientras que en el segundo modelo se incluyó una cuarta población ancestral, que integró datos de las poblaciones latinoamericanas (CLM y MXL) para capturar de manera más precisa la diversidad genética de los pacientes.

Los resultados de ambos análisis fueron visualizados con karyoploteR, lo que permitió una representación gráfica de las asignaciones de ancestría a lo largo del cromosoma 16.

### 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *Análisis de ancestría global*

Las bases de datos correspondientes a los 26 pacientes y 776 individuos de las poblaciones de referencia (CLM, MXL, CEU, IBS, YRI, ESN, CHB y CDX) fueron generadas de acuerdo con la metodología previamente descrita. Tras el proceso de consolidación y filtrado de variantes, se obtuvo el conjunto de SNPs compartidos por ambos grupos.

#### *Control de calidad de los datos*

Para evaluar la calidad de los datos obtenidos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) utilizando PLINK, con el objetivo de examinar los patrones de agrupamiento de los individuos en comparación con poblaciones de referencia. Para este análisis, se incluyeron un total de 802 individuos de diferentes poblaciones: asiáticas (100 CDX y 106 CHB), europeas (107 IBS y 99 CEU), africanas (100 ESN y 107 YRI), latinoamericanas (95 CLM y 64 MXL), así como 26 pacientes con Morquio A (MOR).

En el primer análisis, se incluyeron 10,151,999 variantes (Figura 15, PCA preliminar). Se observó que los individuos MOR se encontraban fuera de las agrupaciones correspondientes a las poblaciones de referencia, por lo que se realizó un filtrado de calidad, usando PLINK, para excluir las variantes con una tasa de genotipado inferior al 10%. Este paso redujo el conjunto de datos a 4,581,755 variantes.

Finalmente, se realizó un segundo PCA para evaluar la consistencia de los datos después del filtrado (Figura 15, PCA final). En este segundo análisis, la muestra MOR005 se sostuvo como un outlier en relación con el resto de los individuos MOR, por lo que se decidió excluirla del conjunto de datos para los análisis posteriores, para garantizar la homogeneidad de los datos.

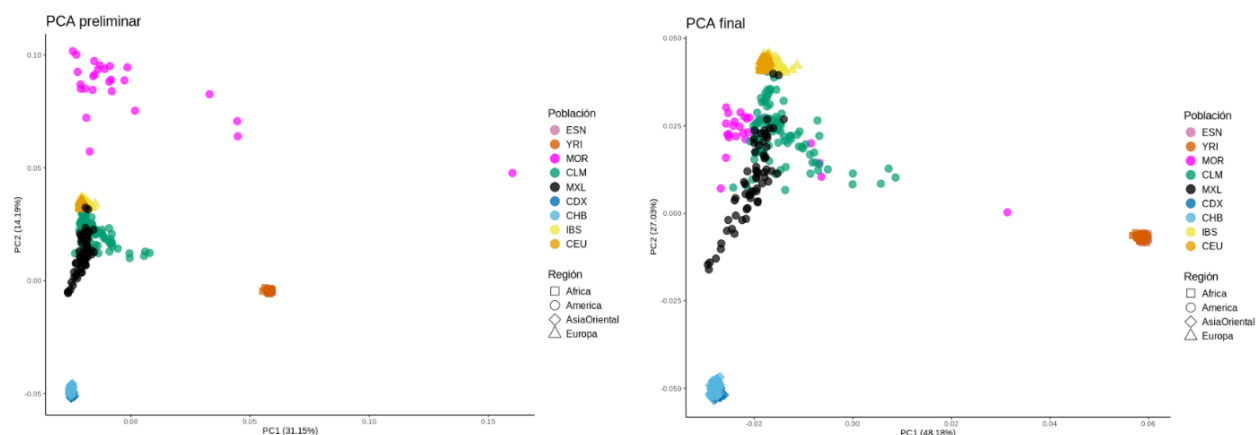


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA)

## Estadísticos F

### F3

Para este análisis se utilizaron varias combinaciones de tres poblaciones ("h1", "h2" y "target"), teniendo en cuenta que F3 representa una medida de cercanía genética entre las poblaciones h1 y h2 con respecto a una población fija externa a ambas (outgroup o target). Los valores más altos de F3 representaron más cercanía genética entre las poblaciones h1 y h2.

Para h1 = MOR (pacientes) y target = IBS (Ibéricos), los valores de F3 mostraron un máximo en poblaciones asiáticas (CHB y CDX), seguidas de los mexicanos (MXL) y las poblaciones africanas (YRI y ESN). La población colombiana (CLM) presentó un valor de F3 más bajo, lo que indicó que los individuos MOR están más distantes genéticamente de los CLM que de otras poblaciones no europeas. Este hallazgo resalta que, en términos de ancestría europea, los pacientes MOR presentan una mayor distancia genética con respecto a los europeos IBS en comparación con la cohorte CLM (Figura 16).

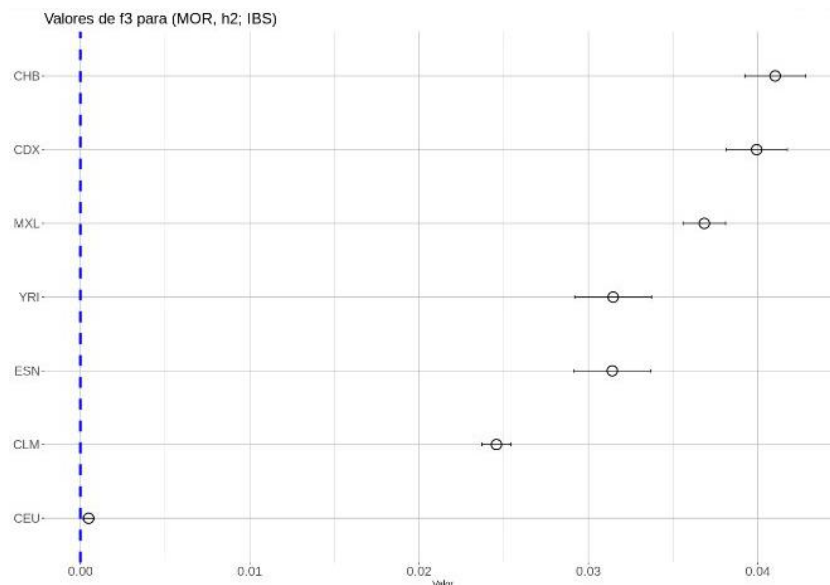


Figura 16. Valores del estadístico F3 para h1=MOR y target=IBS

Para h1 = MXL y target = IBS, los valores de F3 muestran un máximo en las poblaciones asiáticas, seguidas por los MOR y, finalmente, por las poblaciones africanas y la colombiana, las cuales presentan valores de F3 muy similares entre sí. Estos resultados indican que los pacientes MOR tienen una menor distancia genética con los mexicanos que con los colombianos, lo que podría reflejar la influencia de un componente ancestral

no incluido explícitamente en este análisis, probablemente relacionado con un origen amerindio compartido entre MXL y MOR. Esto refuerza la idea de una conexión histórica entre las poblaciones indígenas que pudo haber influido en la composición genética de estas poblaciones (Figura 17).

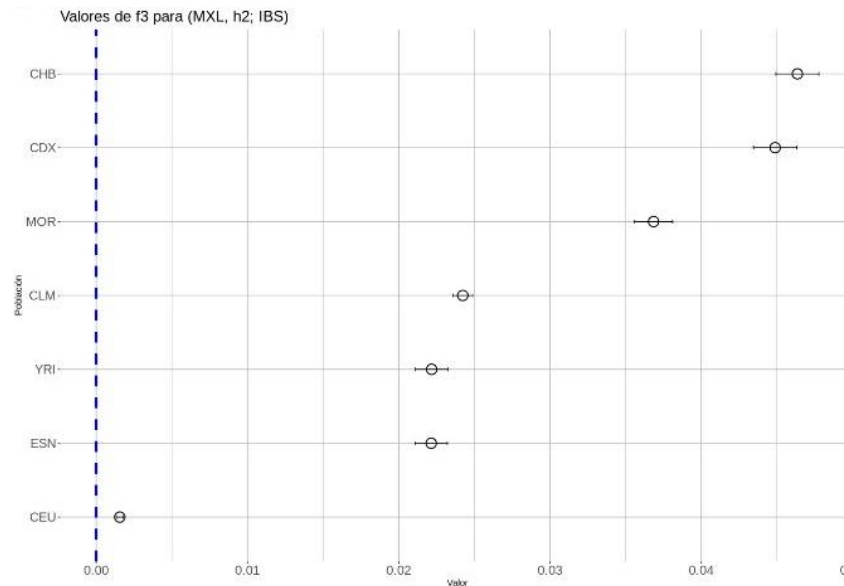


Figura 17. Valores del estadístico  $F_3$  para  $h_1=MXL$  y  $target=IBS$

## D

Para este análisis se utilizaron varias combinaciones de cuatro poblaciones ("h1", "h2", "h3" y "h4"), teniendo en cuenta que D se puede utilizar como una prueba de mezcla entre poblaciones, dando información tanto sobre la presencia como la direccionalidad de dicha mezcla. Valores significativamente positivos indicaron una posible cercanía genética entre las poblaciones h1 y h3 o h2 y h4, mientras que valores significativamente negativos indicaron cercanía genética entre las poblaciones h1 y h4 o h2 y h3. El corte para la significancia estadística ( $Z$ ) fue un valor absoluto de 3.

El estadístico D para la combinación (MOR, IBS; h3, YRI), reflejó señales de mezcla genética diferencial entre las poblaciones h3 y las referencias (Figura 18). Los valores significativamente negativos ( $Z \leq -3$ ) observados en CEU y CLM indican una mayor proximidad genética entre las poblaciones ibéricas y estas poblaciones, sugiriendo una influencia compartida posiblemente de origen europeo. Por otro lado, las poblaciones asiáticas (CHB y CDX) y mexicana (MXL) presentaron valores positivos significativos ( $Z \geq 3$ ), lo que implica una mayor cercanía genética entre la población de pacientes MOR y estas poblaciones. Estos resultados resaltan que la relación entre MOR y las poblaciones mexicanas podría estar mediada por contribuciones ancestrales compartidas, posiblemente asociadas a un componente indígena.

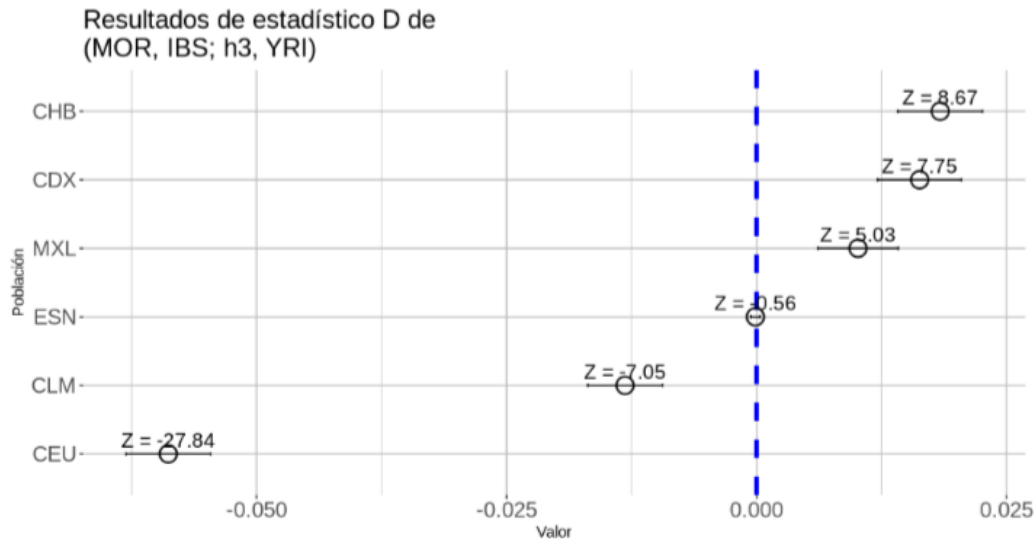


Figura 18. Estadístico D para  $h1=MOR$ ;  $h2=IBS$  y  $h4=YRI$

Para la combinación MOR, YRI;  $h3$ , CHB, la población ESN mostró un valor de D altamente negativo y significativo ( $Z = -111.82$ ), indicando una fuerte proximidad genética con YRI, como era de esperarse debido a sus orígenes africanos compartidos y nos permite confirmar la calidad de los datos. Por otro lado, IBS tuvo un valor de D positivo, pero no significativo ( $Z = 1.4$ ), lo que confirma la menor cercanía genética entre MOR e IBS. Las poblaciones americanas, CLM y MXL, mostraron valores positivos y significativos, indicando mezcla genética, siendo particularmente fuerte entre MOR y MXL, confirmando el componente ancestral compartido entre estas poblaciones (Figura 19).

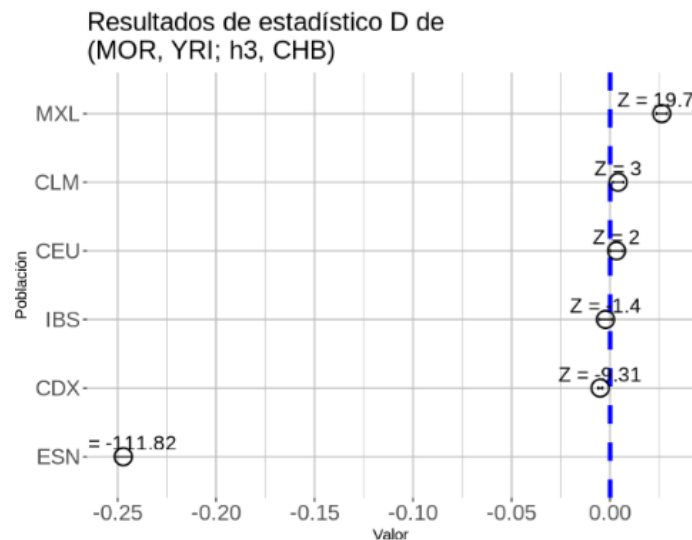


Figura 19. Estadístico D para  $h1=MOR$ ;  $h2=YRI$  y  $h4=CHB$

## F4-ratio

El análisis con el estadístico F4-ratio permitió estimar la proporción de ancestría ( $\alpha$ ) contribuida por una población de referencia (h2) a la población de interés (x). En este caso, se evaluaron cinco poblaciones: h1, h2, h3, h4, y x, donde la arquitectura del estadístico aísla el valor de  $\alpha$ , representando la contribución de ancestría de h2 a x. Los resultados estadísticamente significativos ( $Z \geq 3$ ) se resumen en la Tabla 8, mostrando contribuciones variables entre las poblaciones analizadas.

Tabla 8. Valores de F4-ratio con significancia estadística

| h1  | h2  | h3  | h4  | x   | $\alpha$ | Contribución de ancestría<br>h2 a x | Z-score |
|-----|-----|-----|-----|-----|----------|-------------------------------------|---------|
| CEU | IBS | CHB | YRI | MXL | 0,46     | 46%                                 | 45,13   |
| CEU | IBS | CHB | YRI | MOR | 0,19     | 19%                                 | 6,33    |
| CEU | IBS | CHB | YRI | CLM | 0,46     | 46%                                 | 46,83   |
| MXL | CLM | YRI | CHB | MOR | 0,92     | 92%                                 | 29,20   |
| CDX | CHB | IBS | YRI | MXL | 0,29     | 29%                                 | 49,44   |
| CDX | CHB | IBS | YRI | MOR | 0,10     | 10%                                 | 8,01    |
| CDX | CHB | IBS | YRI | CLM | 0,07     | 7%                                  | 15,73   |

Los valores de  $\alpha$  más altos se observaron para la combinación MXL, CLM, YRI, CHB, MOR ( $\alpha = 0,92$ ;  $Z = 29,20$ ), indicando que un 92% de la ancestría de la población MOR proviene de la población colombiana, lo que era de esperarse por el origen geográfico de los pacientes. En contraste, la contribución de ancestría asiática a la cohorte MOR, así como a la población colombiana fue significativamente menor, comparado con la contribución a la población mexicana donde alcanza el 29%, lo que refleja probables flujos génicos históricos, como la interacción de México con poblaciones asiáticas en el contexto del comercio transpacífico (161).

En las combinaciones donde las poblaciones ibéricas (IBS) actuaron como h2, los resultados mostraron contribuciones importantes de ancestría europea a las poblaciones latinoamericanas. Por ejemplo, en CLM y MXL, se observó que aproximadamente el 46% de su ancestría proviene de esta fuente, lo cual es consistente con la colonización europea de América Latina y el consiguiente flujo génico (149). En el caso de los pacientes MOR, la contribución europea fue menor, reflejando una influencia genética más limitada en comparación con CLM y MXL, lo que sugiere una mayor proporción de componentes ancestrales, probablemente amerindios en esta población.

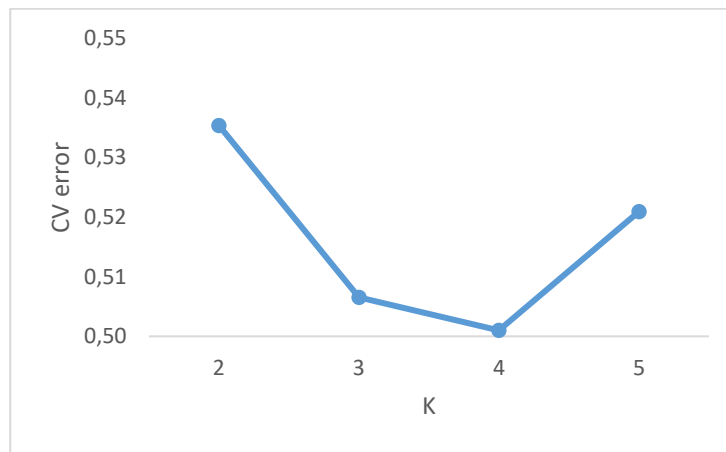
Finalmente, si cuando se analiza únicamente la cohorte de pacientes, se asume que el 92% de la ancestría, utilizando este estadístico, fue asignado a la población colombiana.

Sin embargo, dado que la población colombiana es, a su vez, una mezcla de componentes genéticos europeos, amerindios y africanos, este resultado no permite establecer las proporciones específicas de cada componente ancestral. Esto pone en manifiesto la capacidad limitada del estadístico F4-ratio para discriminar entre las contribuciones genéticas internas de una población mezclada como Colombia, y subraya la necesidad de herramientas adicionales para evaluar con mayor precisión la estructura genética de poblaciones complejas (161,162).

### *Estimación de la ancestría genética global*

El análisis de ancestría global utilizando el software ADMIXTURE permitió inferir la estructura poblacional basada en componentes ancestrales hipotéticos.

Se evaluaron múltiples valores de K (número de grupos ancestrales) con el propósito de identificar el modelo que mejor representara la estructura genética de las poblaciones analizadas. El valor óptimo de K se seleccionó utilizando el criterio de validación cruzada, basado en la minimización del error (CV error o Cross-Validation Error). Este análisis indicó que K=4 era el modelo más adecuado, ya que presentó el menor CV error (Figura 20).



*Figura 20. Valores de error de CV para diferentes K*

Como parte del análisis de estructura genética, se graficaron las proporciones de los componentes ancestrales para cada valor de K, con el objetivo de evaluar la composición genética y su correspondencia con las poblaciones ancestrales. Para K=2, los resultados revelan únicamente dos clústeres principales que no reflejan con precisión la complejidad de las poblaciones ancestrales, agrupando a las poblaciones en grandes bloques sin una diferenciación clara entre las contribuciones africanas, europeas y asiáticas (Figura 21.).

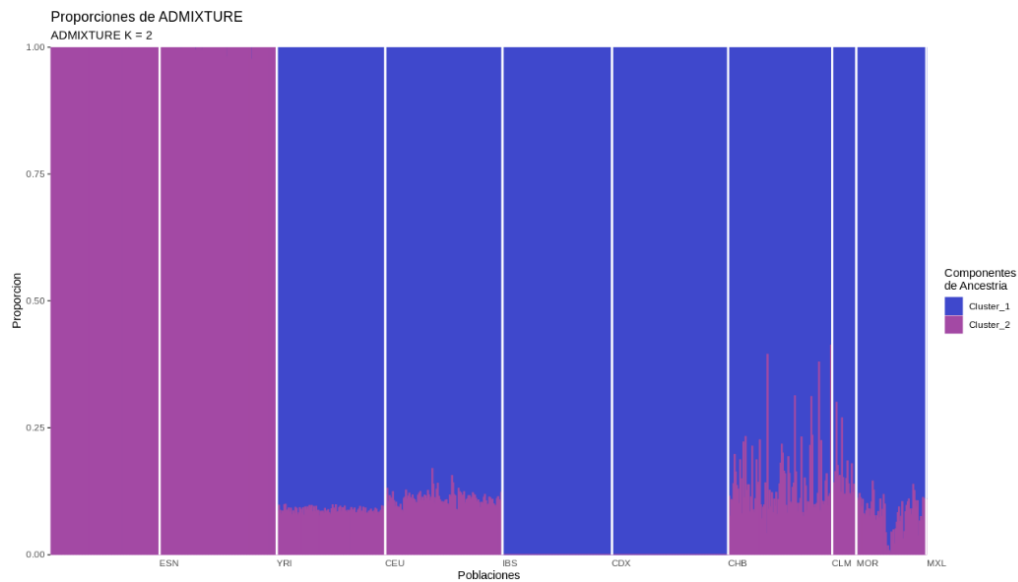


Figura 21. Proporciones de Admixture para K=2

Al aumentar K=3, emerge un tercer componente ancestral predominante en las poblaciones europeas (CEU, IBS), mientras que las poblaciones latinoamericanas (CLM, MXL, MOR) presentan una mezcla variable de los tres componentes identificados. Este patrón es consistente con el origen tricontinental característico de las poblaciones latinoamericanas, pero no logra capturar la contribución específica de la ancestría amerindia, que queda subrepresentada entre los componentes modelados (Figura 22.).

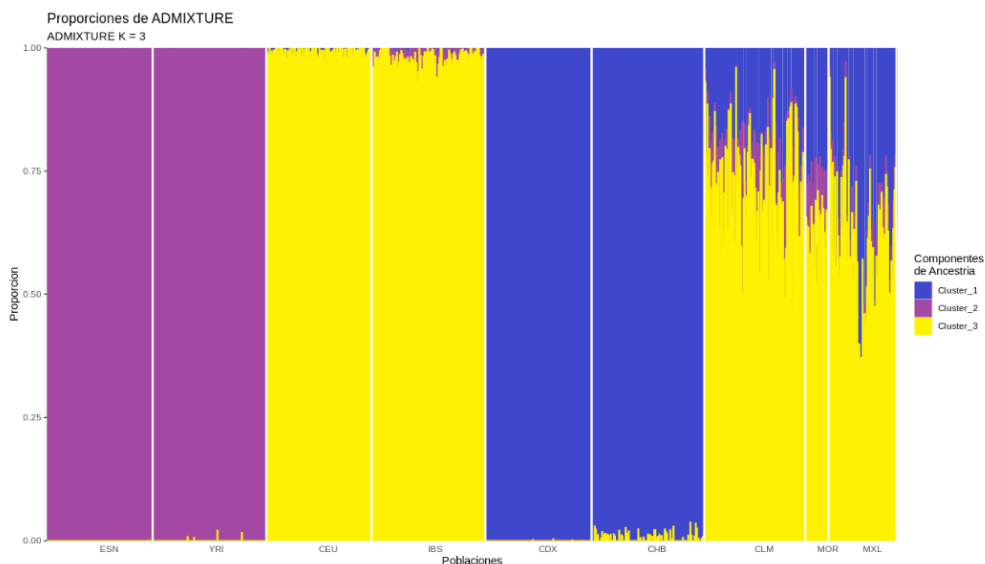


Figura 22. Proporciones de Admixture para K=3

Para K=4, se evidencia una mejor resolución de la estructura genética. Se distinguen claramente los tres componentes ancestrales principales (africano, europeo y asiático), junto con un cuarto clúster que aparece predominantemente en las poblaciones latinoamericanas, especialmente en MXL y MOR. Este cuarto clúster probablemente

corresponde a la ancestría amerindia, reflejando la contribución de poblaciones indígenas locales. Este hallazgo es especialmente relevante en las muestras MOR, donde se observa una proporción significativa de este componente, diferenciándolas de las CLM, que muestran una contribución menor del mismo. Sin embargo, este cuarto clúster no puede asignarse con precisión a un origen amerindio específico, ya que el modelo no incluyó datos de poblaciones indígenas como referencia, limitando la capacidad de identificar específicamente esta contribución (Figura 23.).

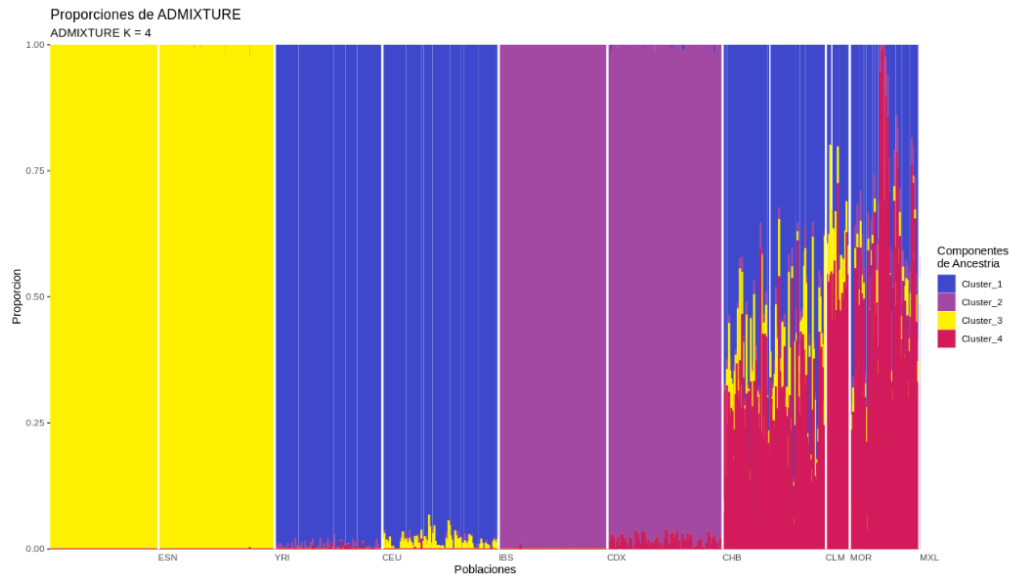


Figura 23. Proporciones de Admixture para K=4

Finalmente, al considerar K=5, los resultados parecen sobreajustar el modelo al dividir las proporciones ancestrales en cinco clústeres. Este nuevo clúster es asignado casi exclusivamente a la población de pacientes con MPS IVA (MOR), excluyendo en gran medida la contribución de los demás clústeres ancestrales en esta cohorte, lo que podría ser indicativo de artefactos metodológicos o de una señal genética que aún no está bien caracterizada (Figura 24.).

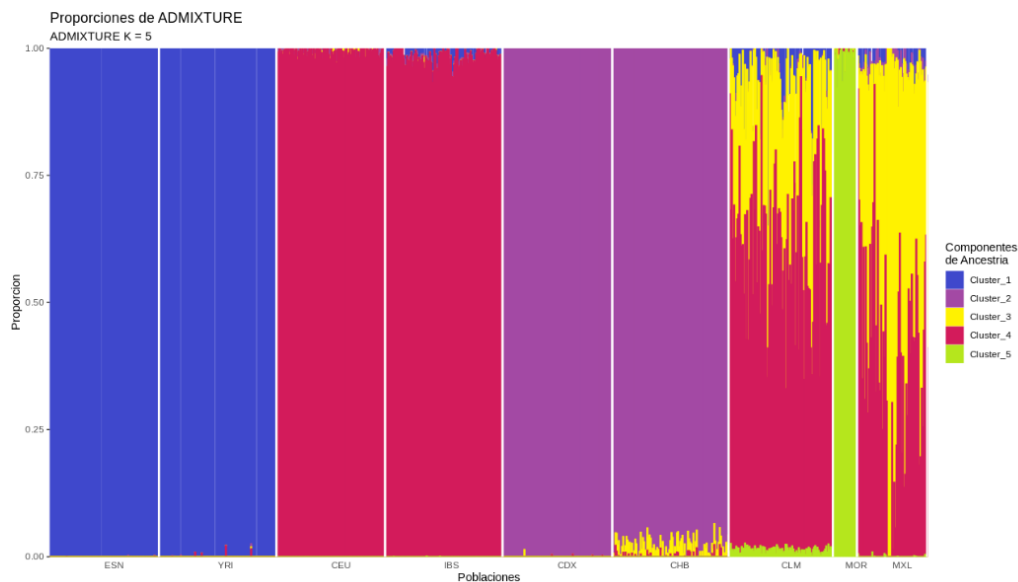


Figura 24. Proporciones de Admixture para K=5

Los análisis realizados permiten identificar patrones clave en la composición genética de las poblaciones estudiadas y resaltan la utilidad de los modelos de mezcla genética para caracterizar la estructura poblacional. En concordancia con estudios previos, los valores de K bajos (K=2 y K=3) no capturan completamente la complejidad genética de las poblaciones latinoamericanas, que representan contribuciones africanas, europeas y amerindias (157,162,163)

### Haplogrupos mitocondriales

El análisis de haplogrupos mitocondriales en la cohorte de pacientes reveló una diversidad significativa en los linajes maternos, con presencia de haplogrupos de poblaciones amerindias, africanas y euroasiáticas, como se muestra en la Figura 25.

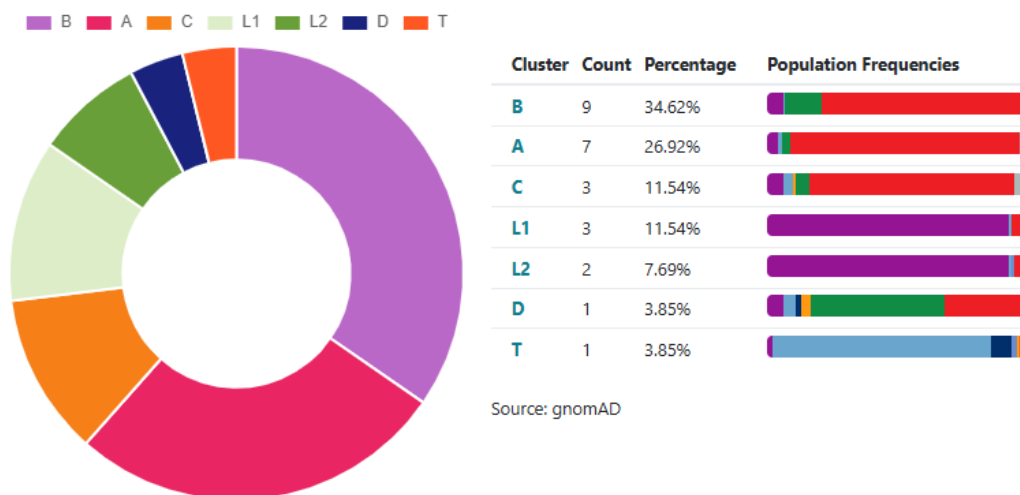


Figura 25. Frecuencia de haplogrupos mitocondriales

Entre los haplogrupos identificados, los más comunes fueron A, B y C (73%), que son característicos de linajes maternos amerindios. Estos resultados respaldan los patrones observados en las redes de haplotipos obtenidas en análisis previos, los cuales sugieren la existencia de un ancestro común de origen latino como posible fundador de la mutación p.G301C en la población colombiana. Además, la hipótesis de un origen autóctono para la mutación se ve reforzada por la evidencia de Pachajoa et al., quienes observaron rasgos compatibles con el síndrome de Morquio en la cerámica de la cultura Tumaco-Tolita, indicando la posible presencia de esta condición en poblaciones precolombinas de la región (153).

Por otra parte, se identificaron varios haplogrupos del clúster L, como L1b1a3 y L2c, lo cual indica una herencia materna africana en estos pacientes. Lo anterior, refleja la mezcla genética característica de la población colombiana, dada su historia de migración y mezcla poblacional (164).

Adicionalmente, es importante resaltar que en los pacientes con haplogrupos africanos, se observa una menor frecuencia de la variante G301C en comparación con los pacientes que presentan haplogrupos amerindios. De los individuos con haplogrupos africanos (L1b1a3 en MOR005, L2c en MOR006 y MOR012, y L1c3b1\* en MOR023 y MOR034), solo MOR023 es homocigoto para G301C, los demás individuos presentan otras variantes patogénicas. MOR005, por ejemplo, es homocigoto para R386C, una variante reportada en diversas poblaciones, incluidas España, Argentina, China, Italia, Colombia, Polonia, Turquía, Chile y Brasil (90,100); MOR006 es heterocigoto compuesto para G301C y F216Sfs3, siendo esta última una variante no reportada previamente; MOR012 es heterocigoto compuesto para W325X y R94C, ambas reportadas en pacientes del continente asiático (90,126); y MOR034 es heterocigoto compuesto para R94C y G333D, esta última reportada, hasta la fecha, en pacientes colombianos (124). Esto sugiere que, aunque los linajes africanos están presentes en la población colombiana, no están relacionados directamente con G301C, pero podrían haber introducido o retenido otras variantes dentro de esta población (164).

### ***Análisis de ancestría local***

Tras el preprocesamiento de los datos genotípicos iniciales con Plink, el archivo VCF fue faseado con Beagle, lo que facilitó la separación de haplotipos en cada individuo, de acuerdo con el mapa de recombinación del cromosoma 16 del GRCh38.

Una vez completado el faseo, los datos fueron analizados con Gnomix, realizando dos análisis: para el primer análisis, se entrenó el modelo utilizando solo tres poblaciones ancestrales (Asia, Europa y África), con el objetivo de evaluar la contribución tricontinental;

mientras que, en el segundo análisis, se incluyó la población americana (modelo cuatricontinental) que buscó realizar una caracterización más completa de la población estudiada.

### *Modelo de tres poblaciones*

El modelo entrenado de Gnomix con tres poblaciones ancestrales (Asia, Europa y África) presentó una precisión del 99.2% en la asignación de ancestrías locales. En este análisis, todos los cromosomas portadores de la mutación G301C fueron asignados a una ancestría exclusivamente europea. En la Figura 26, se presentan los resultados para dos pacientes homocigotos para la mutación G301C, donde se destaca el locus europeo correspondiente al gen *GALNS*.

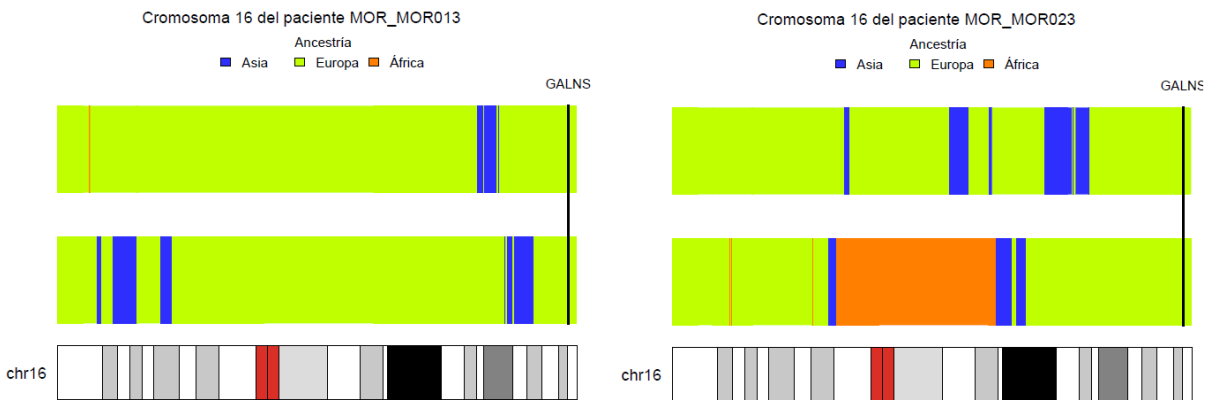


Figura 26. Ancestría local para homocigotos G301C por modelo tricontinental

Estos resultados demuestran que el modelo tricontinental tiene limitaciones para capturar la compleja historia genética de los pacientes estudiados. Como se discutió en capítulos previos, la variante G301C está asociada con una ancestría predominantemente amerindia, lo cual no se refleja en este análisis. Dado que los individuos latinoamericanos presentan una genética influenciada por la mezcla histórica de poblaciones amerindias, europeas y africanas, el modelo de tres poblaciones no logra representar adecuadamente esta diversidad ancestral (162) y subraya la importancia de incluir una población de referencia amerindia en futuros análisis para obtener una caracterización más precisa de la ancestría local en estos pacientes (161).

De manera similar, todos los loci correspondientes al gen *GALNS* de la variante R386C fueron asignados a una ancestría europea. Este resultado adquiere especial relevancia en el caso del paciente MOR005 (R386C/R386C), quien fue excluido de los análisis de ancestría global al comportarse como un outlier con una marcada afinidad hacia la población africana, corroborada además por su asignación al haplogrupo mitocondrial

africano L1b1a3. En este paciente, el locus asociado al gen GALNS también fue asignado a una ancestría europea (Figura 27). Sin embargo, dado que la variante R386C se ha reportado con mayor frecuencia en pacientes de España y América Latina (96,98,107), no es posible determinar si esta asignación refleja una limitación del modelo o si, efectivamente, la variante tiene un origen europeo.

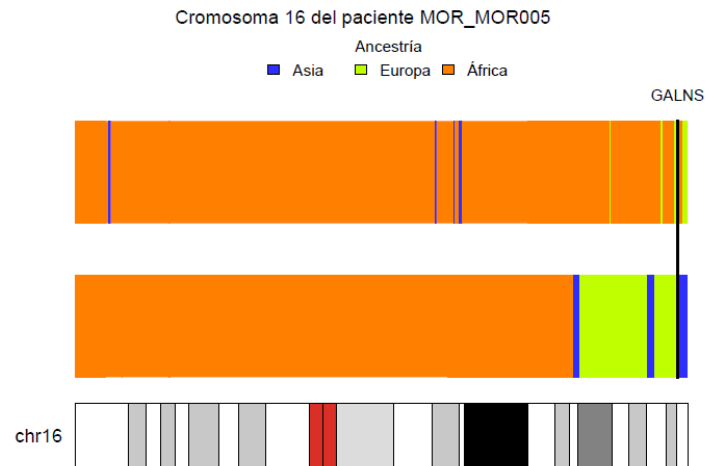


Figura 27. Ancestría local para MOR005 por modelo tricontinental

Por otra parte, en el caso de los cromosomas portadores de otras combinaciones de alelos, el modelo permitió asignar de manera precisa el origen ancestral de ambos cromosomas. Para los pacientes MOR001 (G301C/S80L), MOR006 (G301C/F216Sfs\*3), MOR012 (W325\*/R94C) y MOR015 (G301C/W325\*), se logró una asignación completa de ancestría en el locus GALNS tal como se observa en la Figura 28.

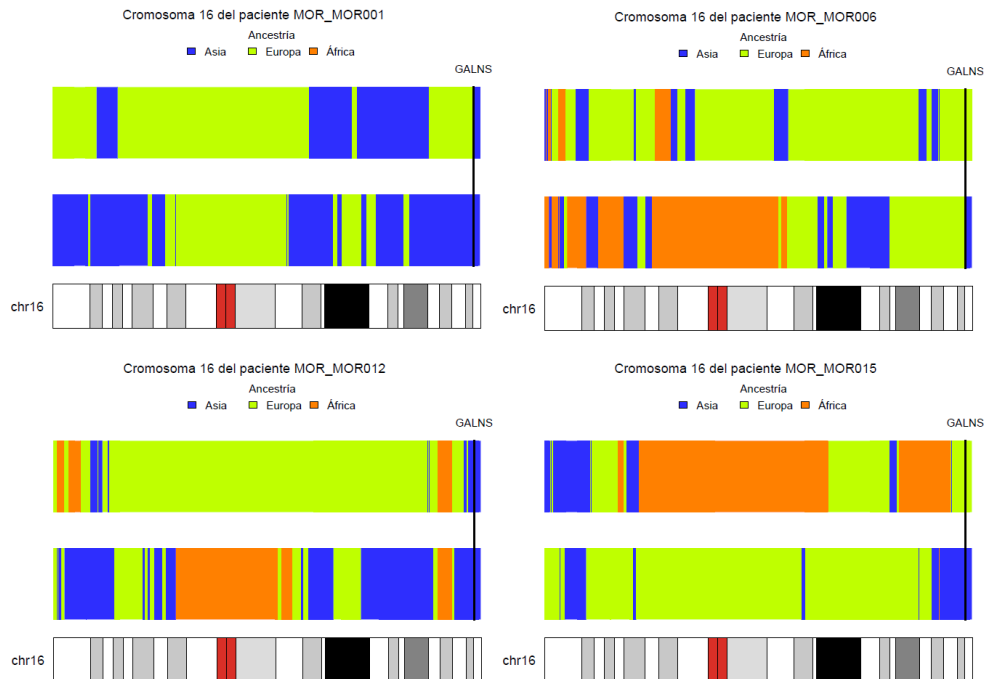


Figura 28. Ancestría local para heterocigotos compuestos por modelo tricontinental

La relación entre el origen ancestral de los loci de *GALNS* y las frecuencias poblacionales de las mutaciones analizadas resalta la utilidad de los modelos de ancestría local para interpretar la distribución geográfica y genética de variantes patogénicas. Por ejemplo, la variante p.W325X, reportada con mayor frecuencia en pacientes de China (126,127), fue asignada a una ancestría asiática, lo cual resulta coherente con esa distribución. De manera similar, la variante p.R94C, identificada principalmente en el Medio Oriente (107), también fue asignada a una ancestría asiática, en concordancia con su prevalencia geográfica.

En contraste, la variante p.S80L, previamente detectada en el Reino Unido y Colombia (122,123), fue asignada a una ancestría asiática, lo que plantea interrogantes sobre posibles flujos genéticos que conecten estas regiones. Por otra parte, la variante p.G333D, reportada exclusivamente en pacientes colombianos (124), fue asignada a una ancestría europea; sin embargo, esta asignación resulta difícil de interpretar debido a las limitaciones del modelo para distinguir entre ancestrías europea y americana en el contexto de poblaciones mestizas.

En el caso particular del loci para la variante F216Sfs\*3, que no ha sido reportada previamente en la literatura, el modelo asignó una ancestría asiática. Aunque este resultado no puede ser contrastado directamente con información poblacional previa, sugiere un posible origen que debe ser validado mediante análisis posteriores.

#### *Modelo de cuatro poblaciones*

Con el objetivo de capturar de manera más precisa la diversidad genética de la población mestiza, se realizó un nuevo entrenamiento del modelo que incluyó las poblaciones latinoamericanas de México (MXL) y Colombia (CLM). Este modelo presentó una precisión de 91.9%, el cual fue inferior al del modelo tricontinental, que alcanzó una precisión de 99.2%.

En este análisis, todos los cromosomas portadores de la mutación G301C fueron asignados a una ancestría predominantemente americana. En la Figura 29 se muestran los resultados para dos pacientes homocigotos para la mutación G301C, donde se evidencia una redistribución significativa de los loci anteriormente asociados a ancestrías asiática y europea, que ahora fueron asignados a la ancestría americana.

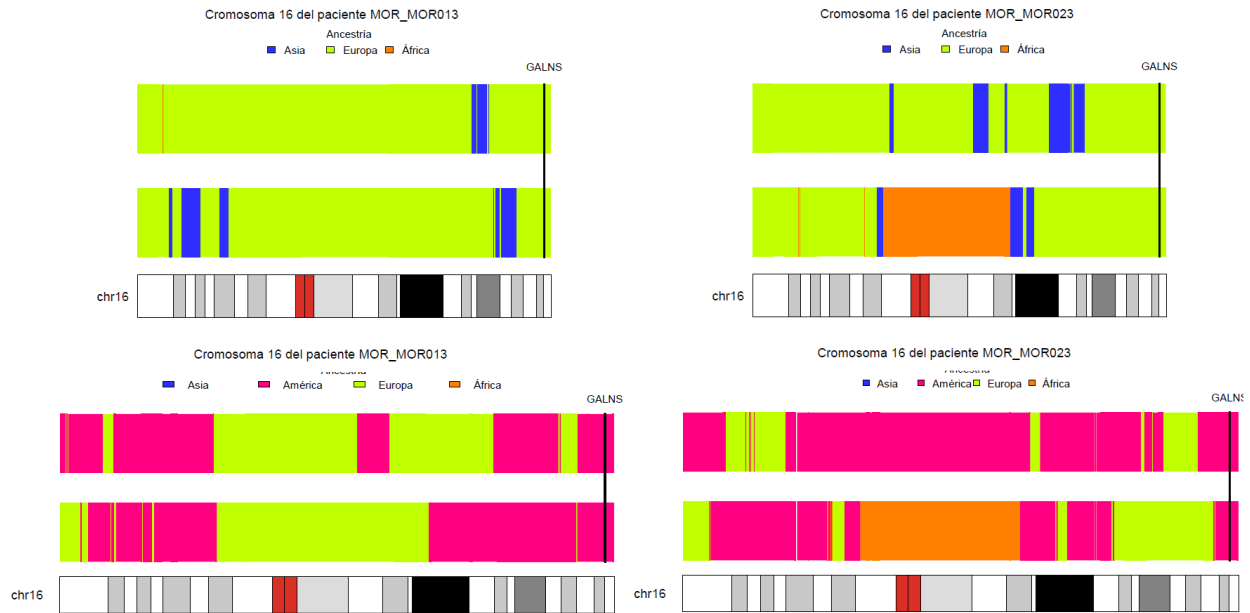


Figura 29. Comparación de ancestría local para homocigotos G301C por modelo tricontinental y cuatricontinental

La pérdida de loci previamente asignados a una ancestría europea puede explicarse por la proximidad genética entre los individuos colombianos y las poblaciones europeas. Esta cercanía, resultado de la mezcla histórica entre europeos y amerindios durante la colonización (164), podría haber desplazado las señales europeas hacia la ancestría americana al incluir los CLM como una referencia en el modelo.

Por otro lado, la dilución de la ancestría asiática puede atribuirse a la cercanía genética demostrada entre las poblaciones mexicanas y asiáticas. Estudios previos han identificado componentes genéticos compartidos entre estas regiones debido a migraciones antiguas, lo que pudo haber influido en que las asignaciones asiáticas fueran absorbidas por la ancestría americana cuando se incluyó a los MXL como referencia (161).

Finalmente, dado que en todos los casos el locus correspondiente al gen *GALNS* fue asignado a una ancestría americana, estos resultados no fueron considerados para la identificación de loci de ancestría local. Estos hallazgos subrayan la necesidad de incorporar un mayor número de datos genómicos de poblaciones amerindias en el entrenamiento de los modelos, especialmente en el caso de poblaciones mestizas, cuya mezcla genética requiere una representación más precisa para mejorar la asignación de las ancestrías y capturar su diversidad genética adecuadamente.

## CONCLUSIONES

La mutación p.G301C del gen *GALNS* fue identificada como la variante más prevalente en pacientes colombianos con MPS IVA, representando el 71% de los alelos estudiados. Este hallazgo resalta la relevancia de esta mutación como marcador genético para el diagnóstico y como objetivo potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas en esta población. Además, la correlación entre los perfiles genéticos y los fenotipos clínicos confirmó su asociación con fenotipos clásicos o severos, subrayando su importancia en el pronóstico de la enfermedad.

El análisis regional mostró una alta concentración de casos en el Eje Cafetero, lo que sugiere un efecto fundador relacionado con patrones históricos de migración interna en Colombia. Adicionalmente, se caracterizó el impacto funcional de la mutación intrónica c.121-11G>C, la cual afecta el procesamiento del ARN mensajero, y se describió por primera vez la variante p.F216Sfs\*3, ampliando el conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos y el espectro mutacional del gen *GALNS*.

El análisis de haplotipos por genoma completo reveló un bloque haplotípico conservado de 68.9 Mb asociado a la variante p.G301C, proporcionando evidencia sólida de un efecto fundador en la población colombiana. Este haplotipo predominante, compartido por los individuos homocigotos evaluados, permitió estimar la edad mutacional en, aproximadamente, 1535 años, situando el origen de la variante en un contexto histórico prehispánico.

La evaluación de los seis SNPs intragénicos reportados en la literatura, para el estudio de efectos fundadores en MPS IVA, no fue útil para caracterizar asociaciones haplotípicas específicas en el gen *GALNS*. La alta frecuencia de algunos haplotipos en individuos sanos y en pacientes portadores de mutaciones diferentes a p.G301C pone en duda su capacidad para diferenciar eventos poblacionales específicos, como el efecto fundador de esta variante.

El análisis de ancestría global evidenció una composición genética mixta en los pacientes, con predominio de componentes europeos y, probablemente, amerindios, reflejando la compleja historia de mezcla genética en Colombia. Además, la mayor proporción de ancestría amerindia observada en los pacientes respalda el origen colombo-prehispánico de la mutación p.G301C.

Por último, en el análisis de ancestría local, se logró asignar el locus *GALNS* a las poblaciones ancestrales correspondientes en variantes como p.R94C, p.S80L y p.W325X, las cuales fueron asociadas consistentemente a una ancestría asiática. Sin embargo, los

modelos utilizados mostraron limitaciones al diferenciar entre ancestrías europeas y americanas, destacando la necesidad de incluir referencias genómicas más representativas de poblaciones nativo-americanas para mejorar la precisión de los análisis en contextos de mezcla genética.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annu Rev Med*. 2015;
2. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. 2006.
3. Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*. 2011;
4. Tomatsu S, Okamura K, Maeda H, Taketani T, Castrillon S V., Gutierrez MA, et al. Keratan sulphate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Inherit Metab Dis*. 2005;
5. Önçağ G, Ertan Erdinç AM, Cal E. Multidisciplinary treatment approach of Morquio Syndrome (mucopolysaccharidosis type IVA). *Angle Orthodontist*. 2006;
6. Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio a syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. 2015.
7. Montañó AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T. International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis*. 2007;
8. Tomatsu S, Montano AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, et al. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jun;12(6):931–45.
9. Concolino D, Deodato F, Parini R. Enzyme replacement therapy: Efficacy and limitations. *Ital J Pediatr*. 2018;
10. Sawamoto K, González JVÁ, Piechnik M, Otero FJ, Couce ML, Suzuki Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Diagnosis, treatment, and management. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
11. Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *J Inherit Metab Dis*. 2013;
12. Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. *Hum Mutat*. 2014;
13. Kato Z, Fukuda S, Tomatsu S, Vega H, Yasunaga T, Yamagishi A, et al. A novel common missense mutation G301C in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in mucopolysaccharidosis IVA. *Hum Genet*. 1997;
14. Tapiero-Rodriguez SM, Guio JCA, Porras-Hurtado GL, García N, Solano M, Pachajoa H, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. *Application of Clinical Genetics*. 2018;

15. Fiore M, Pillois X, Nurden P, Nurden AT, Austerlitz F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. *European Journal of Human Genetics*. 2011;
16. De Alencar DO, Netto C, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Ribeiro-dos-Santos Â, Pereira F, et al. Fabry disease: Evidence for a regional founder effect of the GLA gene mutation 30delG in Brazilian patients. *Mol Genet Metab Rep*. 2014;
17. Kirov A, Sarafov S, Pavlova Z, Todorov T, Chamova T, Gospodinova M, et al. Founder effect of the Glu89Gln TTR mutation in the Bulgarian population. *Amyloid*. 2019;
18. Agana M, Frueh J, Kamboj M, Patel DR, Kanungo S. Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. *Ann Transl Med*. 2018;
19. El-Hattab AW. Inborn Errors of Metabolism. *Clinics in Perinatology*. 2015.
20. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 2019.
21. Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. *Arch Dis Child*. 2006;
22. Dionisi-Vici C, Rizzo C, Burlina AB, Caruso U, Sabetta G, Uziel G, et al. Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: A national retrospective survey. *Journal of Pediatrics*. 2002;
23. Waters D, Adeloye D, Woolham D, Wastnedge E, Patel S, Rudan I. Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. *J Glob Health*. 2018;
24. Parkinson-Lawrence EJ, Shandala T, Prodoehl M, Plew R, Borlace GN, Brooks DA. Lysosomal storage Disease: Revealing lysosomal function and physiology. *Physiology*. 2010.
25. Parenti G, Andria G, Ballabio A. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annu Rev Med*. 2015;
26. Cummings RD, Pierce JM. *Handbook of Glycomics*. Handbook of Glycomics. 2010.
27. Williams N, Challoumas D, Ketteridge D, Cundy PJ, Eastwood DM. The mucopolysaccharidoses. *Bone and Joint Journal*. 2017.
28. Lehman TJA, Miller N, Norquist B, Underhill L, Keutzer J. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*. 2011;
29. Sukegawa K, Matsuzaki T, Fukuda S, Masuno M, Fukao T, Kokuryu M, et al. Brother/sister siblings affected with Hunter disease: evidence for skewed X chromosome inactivation. *Clin Genet*. 2008;
30. Tuschl K, Gal A, Paschke E, Kircher S, Bodamer OA. Mucopolysaccharidosis type II in females: Case report and review of literature. *Pediatr Neurol*. 2005;

31. NCBI. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; – [cited 2020 10 04]. Available from: 2004 [cited 2020 Apr 10]. GALNS [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2588>
32. Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet.* 2010;
33. Leong HY, Abdul Azize NA, Chew HB, Keng WT, Thong MK, Mohd Khalid MKN, et al. Clinical, biochemical and genetic profiles of patients with mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A syndrome) in Malaysia: The first national natural history cohort study. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;
34. Morrone A, Tylee KL, Al-Sayed M, Brusius-Facchin AC, Caciotti A, Church HJ, et al. Molecular testing of 163 patients with Morquio A (Mucopolysaccharidosis IVA) identifies 39 novel GALNS mutations. *Mol Genet Metab.* 2014;
35. Tomatsu S, Montaña AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Trandafirescu GG, et al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation.* 2005.
36. Almeciga-Diaz C, Montaña A, Tomatsu S, Barrera L. Contribución Colombiana al Conocimiento de la Enfermedad de Morquio A. *Medicina (B Aires).* 2012 Jul 1;34:221.
37. Morris CP, Guo XH, Apostolou S, Hopwood JJ, Scott HS. Morquio A syndrome: cloning, sequence, and structure of the human N-acetylgalactosamine 6-sulfatase (GALNS) gene. *Genomics.* 1994;22(3):652–4.
38. Tomatsu S, Gutierrez MA, Ishimaru T, Peña OM, Montaña AM, Maeda H, et al. Heparan sulfate levels in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J Inherit Metab Dis.* 2005;
39. Harmatz P, Mengel KE, Giugliani R, Valayannopoulos V, Lin SP, Parini R, et al. The Morquio A Clinical Assessment Program: Baseline results illustrating progressive, multisystemic clinical impairments in Morquio A subjects. *Mol Genet Metab.* 2013;
40. Dhawale AA, Thacker MM, Belthur M V., Rogers K, Bober MB, MacKenzie WG. The lower extremity in morquio syndrome. *Journal of Pediatric Orthopaedics.* 2012;
41. Dalvie S, Skinner J, Vellodi A, Noorden MHH. Mobile thoracolumbar gibbus in morquio type A: The cause of paraparesis and its management. *Journal of Pediatric Orthopaedics Part B.* 2001;
42. Solanki GA, Martin KW, Theroux MC, Lampe C, White KK, Shediak R, et al. Spinal involvement in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio-Brailsford or Morquio A syndrome): Presentation, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis.* 2013;
43. Guarany NR, Schwartz IVD, Guarany FC, Giugliani R. Functional capacity evaluation of patients with mucopolysaccharidosis. *J Pediatr Rehabil Med.* 2012;
44. Zschocke J, Baumgartner M, Morava E, Patterson M, Rahman S, Peters V. JIMD reports. *JIMD Reports.* 2015.

45. Neufeld E, Muenzer J. The Mucopolysaccharidoses | The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease | OMMBID | McGraw-Hill Medical. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 2001;
46. Hendriksz CJ, Al-Jawad M, Berger KI, Hawley SM, Lawrence R, Mc Ardle C, et al. Clinical overview and treatment options for non-skeletal manifestations of mucopolysaccharidosis type IVA. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2013.
47. Walker PP, Rose E, Williams JG. Upper airways abnormalities and tracheal problems in Morquio's disease. *Thorax*. 2003;
48. Hendriksz CJ, Harmatz P, Beck M, Jones S, Wood T, Lachman R, et al. Review of clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidosis IVA. Vol. 110, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013. p. 54–64.
49. Tomatsu S, Averill LW, Sawamoto K, Mackenzie WG, Bober MB, Pizarro C, et al. Obstructive airway in Morquio A syndrome, the past, the present and the future. *Mol Genet Metab*. 2016;
50. Couprie J, Denis P, Guffon N, Reynes N, Masset H, Beby F. Manifestations ophtalmologiques de la maladie de Morquio. *J Fr Ophtalmol*. 2010;
51. Käsmann-Kellner B, Weindler J, Pfau B, Ruprecht KW. Ocular changes in mucopolysaccharidosis IV A (Morquio A syndrome) and long-term results of perforating keratoplasty. *Ophthalmologica*. 1999;
52. Davison JE, Kearney S, Horton J, Foster K, Peet AC, Hendriksz CJ. Intellectual and neurological functioning in Morquio syndrome (MPS IVa). *J Inherit Metab Dis*. 2013;
53. Camelier M V., Burin MG, De Mari J, Vieira TA, Marasca G, Giugliani R. Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clinica Chimica Acta*. 2011;
54. Fukuda S, Tomatsu S, Masuno M, Ogawa T, Yamagishi A, Md. Maruf Rezvi G, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Submicroscopic deletion of 16q24.3 and a novel R386C mutation of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene in a classical morquio disease. *Hum Mutat*. 1996;
55. White KK, Jester A, Bache CE, Harmatz PR, Shediak R, Thacker MM, et al. Orthopedic management of the extremities in patients with Morquio A syndrome. *Journal of Children's Orthopaedics*. 2014.
56. Bothun ED, Decanini A, Summers CG, Orchard PJ, Tolar J. Outcome of penetrating keratoplasty for mucopolysaccharidoses. *Archives of Ophthalmology*. 2011;
57. Sawamoto K, Suzuki Y, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Yabe H, et al. Current therapies for Morquio A syndrome and their clinical outcomes. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2016.
58. Tomatsu S, Montão AM, Dung VC, Ohashi A, Oikawa H, Oguma T, et al. Enhancement of drug delivery: Enzyme-replacement therapy for murine morquio a syndrome. *Molecular Therapy*. 2010;

59. Yabe H, Tanaka A, Chinen Y, Kato S, Sawamoto K, Yasuda E, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for Morquio A syndrome. *Mol Genet Metab*. 2016;
60. Kamata Y, Tanabe A, Kanaji A, Kosuga M, Fukuhara Y, Li XK, et al. Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Therapy*. 2003.
61. Leal AF, Alméciga-Díaz CJ. Efficient CRISPR/Cas9 nickase-mediated genome editing in an in vitro model of mucopolysaccharidosis IVA. *Gene Ther* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Dec 14];30(1–2):107–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35581402/>
62. Alméciga-Díaz CJ, Barrera LA. Design and applications of gene therapy vectors for mucopolysaccharidosis in Colombia. *Gene Ther*. 2020;
63. Star B, Spencer HG. Effects of genetic drift and gene flow on the selective maintenance of genetic variation. *Genetics*. 2013;
64. Cabrero J, Camacho J. Fundamentos de genética de poblaciones. In: *EVOLUCIÓN, La base de la Biología*. 2000.
65. Kivisild T. Founder Effect. In: Maloy S, Hughes K, editors. *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* [Internet]. Second Edition. San Diego: Academic Press; 2013. p. 100–1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749840005520>
66. Cormack RM, Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. *Biometrics*. 1990;
67. Slatkin M. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. *Am J Hum Genet*. 2004;
68. Slatkin M. A Population-Genetic Test of Founder Effects and Implications for Ashkenazi Jewish Diseases. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004 [cited 2024 Jan 31];75(2):282. Available from: </pmc/articles/PMC1216062/>
69. Semplicini C, Bertolin C, Bello L, Pantic B, Guidolin F, Vianello S, et al. The clinical spectrum of CASQ1-related myopathy. *Neurology* [Internet]. 2018 Oct 10 [cited 2024 Jan 31];91(17):e1629. Available from: </pmc/articles/PMC6205688/>
70. Sánchez-Heras AB, Dámaso E, Castillejo A, Robledo M, Teulé A, Lázaro C, et al. Genetic and clinical characterization of a novel FH founder mutation in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2024 Jan 26 [cited 2024 Jan 31];19(1):26. Available from: </pmc/articles/PMC10811853/>
71. Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, et al. Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica* [Internet]. 2009 Oct [cited 2024 Jan 31];94(10):1368. Available from: </pmc/articles/PMC2754952/>
72. Hartl DL. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Jones & Bartlett Learning; 2011.
73. C. HJ, Scott F. *Evolutionary analysis*, Fifth Edition. *Crustaceana*. 2009.

74. Thornton TA, Bermejo JL. Local and Global Ancestry Inference, and Applications to Genetic Association Analysis for Admixed Populations. *Genet Epidemiol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 14];38(0 1):S5. Available from: [/pmc/articles/PMC4339867/](#)
75. Lee SHR, Antillon-Klussmann F, Pei D, Yang W, Roberts KG, Li Z, et al. Association of Genetic Ancestry With the Molecular Subtypes and Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Dec 14];8(3):354. Available from: [/pmc/articles/PMC8796058/](#)
76. Harismendy O, Kim J, Xu X, Ohno-Machado L. Evaluating and sharing global genetic ancestry in biomedical datasets. *J Am Med Inform Assoc* [Internet]. 2019 Mar 14 [cited 2023 Dec 14];26(5):457. Available from: [/pmc/articles/PMC6433181/](#)
77. Mars N, Kerminen S, Feng YCA, Kanai M, Läll K, Thomas LF, et al. Genome-wide risk prediction of common diseases across ancestries in one million people. *Cell Genomics* [Internet]. 2022 Apr 4 [cited 2023 Dec 14];2(4):100118. Available from: [/pmc/articles/PMC9010308/](#)
78. Rodriguez DA, Sanchez MI, Decatur CL, Correa ZM, Martin ER, Harbour JW. Impact of Genetic Ancestry on Prognostic Biomarkers in Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Dec 14];12(11):1–13. Available from: [/pmc/articles/PMC7693692/](#)
79. Jain A, Sharma D, Bajaj A, Gupta V, Scaria V. Founder variants and population genomes—Toward precision medicine. *Adv Genet*. 2021 Jan 1;107:121–52.
80. Shinagawa J, Moteki H, Nishio SY, Noguchi Y, Usami SI. Haplotype Analysis of GJB2 Mutations: Founder Effect or Mutational Hot Spot? *Genes (Basel)* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2024 Feb 5];11(3). Available from: [/pmc/articles/PMC7140863/](#)
81. Kwon WK, Jang HJ, Lee JE, Park YH, Ryu JM, Yu J, et al. Discovery of BRCA1/BRCA2 founder variants by haplotype analysis. *Cancer Genet*. 2022 Aug 1;266–267:19–27.
82. Kumar A, Agarwal S, Pradhan S. Haplotype analysis and LD detection at DM1 locus. *Gene*. 2015 Aug 1;567(1):45–50.
83. Yu CC, Lee AF, Kohl S, Lin MY, Cheng SM, Hung CC, et al. PKD2 founder mutation is the most common mutation of polycystic kidney disease in Taiwan. *NPJ Genom Med* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Feb 6];7(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9249874/](#)
84. Kelkar YD, Strubczewski N, Hile SE, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD. What Is a Microsatellite: A Computational and Experimental Definition Based upon Repeat Mutational Behavior at A/T and GT/AC Repeats. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2010 [cited 2024 Feb 6];2(1):620. Available from: [/pmc/articles/PMC2940325/](#)
85. Yang GM, Wang RM, Xia N, Zheng ZW, Dong Y, Wu ZY. Prevalent Pathogenic Variants of ATP7B in Chinese Patients with Wilson's Disease: Geographical Distribution and Founder Effect. *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Feb 6];12(3):1–10. Available from: [/pmc/articles/PMC7996491/](#)
86. Ramírez-Cheyne J, López D, Payán-Gómez C, Arcos-Burgos M, Saldarriaga W. Fragile X syndrome in the largest world clustering. I. Genetic epidemiology and founder effect outline.

- Am J Med Genet A [Internet]. 2024 May 1 [cited 2024 Sep 28];194(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38164622/>
87. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* [Internet]. 2005 Jan 15 [cited 2024 Sep 28];21(2):263–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15297300/>
  88. Browning SR, Browning BL. Rapid and Accurate Haplotype Phasing and Missing-Data Inference for Whole-Genome Association Studies By Use of Localized Haplotype Clustering. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2007 [cited 2024 Sep 28];81(5):1084. Available from: </pmc/articles/PMC2265661/>
  89. Bahram S, Inoko H. Microsatellite markers for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 2007 8:2 [Internet]. 2007 Feb [cited 2024 Sep 28];8(2):164–164. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrg1962-c1>
  90. Morrone A, Caciotti A, Atwood R, Davidson K, Du C, Francis-Lyon P, et al. Morquio a syndrome-associated mutations: A review of alterations in the GALNS gene and a new locus-specific database. *Hum Mutat*. 2014;
  91. Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Hori T, Nakashima Y, Sukegawa K, et al. Polymerase chain reaction detection of two novel human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene polymorphisms by single-strand conformation polymorphism analysis or by Styl and Stul cleavages. *Hum Genet* [Internet]. 1995 Feb [cited 2024 Sep 28];95(2):243–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7860078/>
  92. Tomatsu S, Fukuda S, Iwata H, Ogawa T, Sukegawa K, Orii T. Polymorphism in the GALNS gene. *Hum Mol Genet*. 1994 Jul;3(7):1208.
  93. Tomatsu S, Fukuda S, Iwata H, Ogawa T, Sukegawa K, Orii T. XhoI and SphI RFLPs in the GALNS gene. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2024 Sep 28];3(7):1208–1208. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/hmg/3.7.1208-a>
  94. Iwata H, Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Rezvi GMM, Ogawa T, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: polymorphic haplotypes and informative RFLPs in the Japanese population. *Hum Genet*. 1995;
  95. Chkioua L, Khedhiri S, Hafsi H, Grissa O, Ben Turkia H, Miled A, et al. Molecular analysis in a GALNS study cohort of 15 Tunisian patients: description of a novel mutation. *Diagn Pathol* [Internet]. 2016 Jun 17 [cited 2024 Sep 28];11(1). Available from: </pmc/articles/PMC4912732/>
  96. Bochernitsan AN, Brusius-Facchin AC, Couto RR, Kubaski F, dos Santos Lopes SS, Gondim CE, et al. Spectrum of GALNS mutations and haplotype study in Brazilian patients with Mucopolysaccharidosis type IVA. *Meta Gene*. 2018;
  97. Moisan L, Iannuzzi D, Maranda B, Campeau PM, Mitchell JJ. Clinical characteristics of patients from Quebec, Canada, with Morquio A syndrome: a longitudinal observational study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2020 Sep 29 [cited 2024 Sep 28];15(1). Available from: </pmc/articles/PMC7526408/>

98. Cárdenas JM, Vergara D, Witting S, Balut F, Guerra P, Mesa JT, et al. Genotype and Phenotype Characterization of Patients with Mucopolysaccharidosis IV-A in Chile. *Mol Syndromol* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2024 Sep 28];14(5):416. Available from: [/pmc/articles/PMC10601820/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35729508/)
99. Sheth H, Naik P, Shah M, Bhavsar R, Nair A, Sheth F, et al. The GALNS p.P77R variant is a probable Gujarati-Indian founder mutation causing Mucopolysaccharidosis IVA syndrome. *BMC Genomics* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Sep 28];23(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35729508/>
100. Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A, Wraith JE, Ferreira P, Di Natale P, et al. Fourteen novel mucopolysaccharidosis IVA producing mutations in GALNS gene. *Hum Mutat* [Internet]. 1997 Jan 1;10(5):368–75. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)10:5<368::AID-HUMU6>3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:5<368::AID-HUMU6>3.0.CO)
101. Montañó AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T. International Morquio A Registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inher Metab Dis*. 2007;
102. Diaz-Ordoñez L, Duque-Cordoba PA, Nieva-Posso DA, Saldarriaga W, Gutierrez-Medina JD, Pachajoa H. Phenotype-Genotype Correlation in Morquio A Syndrome: Protocol for a Meta-Analysis. *JMIR Res Protoc* [Internet]. 2024 Nov 14 [cited 2024 Nov 16];13(1):e56649. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/39541578>
103. Sawamoto K, González JVÁ, Piechnik M, Otero FJ, Couce ML, Suzuki Y, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: Diagnosis, treatment, and management. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020.
104. Lehman TJA, Miller N, Norquist B, Underhill L, Keutzer J. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*. 2011;
105. Jones S, Wynn R. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <https://www.uptodate.com> (Accessed on March 02, 2020.). 2019 [cited 2020 Feb 14]. Mucopolysaccharidoses: Clinical features and diagnosis. Available from: <https://www.uptodate.com/>
106. Komlosi K, Sólyom A, Beck M. The Role of Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders. *J Inborn Errors Metab Screen* [Internet]. 2019 May 30 [cited 2024 Nov 17];4:e160043. Available from: <https://www.scielo.br/j/jiems/a/wpnTqQx8JQjPbsmynMSJh6L/abstract/?lang=en&format=html>
107. Morrone A, Tylee KL, Al-Sayed M, Brusius-Facchin AC, Caciotti A, Church HJ, et al. Molecular testing of 163 patients with Morquio A (Mucopolysaccharidosis IVA) identifies 39 novel GALNS mutations. *Mol Genet Metab*. 2014;
108. Caciotti A, Tonin R, Rigoldi M, Ferri L, Catarzi S, Cavicchi C, et al. Optimizing the molecular diagnosis of GALNS: Novel methods to define and characterize morquio-A syndrome-associated mutations. *Hum Mutat*. 2015;

109. Hendriksz CJ, Berger KI, Giugliani R, Harmatz P, Kampmann C, Mackenzie WG, et al. International guidelines for the management and treatment of Morquio a syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. 2015.
110. Concolino D, Deodato F, Parini R. Enzyme replacement therapy: Efficacy and limitations. *Ital J Pediatr*. 2018;
111. Tomatsu S, Montão AM, Dung VC, Ohashi A, Oikawa H, Oguma T, et al. Enhancement of drug delivery: Enzyme-replacement therapy for murine morquio a syndrome. *Molecular Therapy*. 2010;
112. Wainstock D, Katz A. Advancing rare disease policy in Latin America: a call to action. *The Lancet Regional Health - Americas* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2024 Nov 17];18. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2667193X2300008X/fulltext>
113. Soussand L, Kuchenbuch M, Messiaen C, Sandrin A, Jannot AS, Nabbout R. Impact of the COVID-19 pandemic on the care of rare and undiagnosed diseases patients in France: a longitudinal population-based study. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Nov 17];17(1):1–10. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-022-02580-7>
114. Lee NH, Cho SY, Maeng SH, Jeon TY, Sohn YB, Kim SJ, et al. Clinical, radiologic, and genetic features of Korean patients with Mucopolysaccharidosis IVA. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2012 Nov 23 [cited 2024 Nov 16];55(11):430–7. Available from: <http://www.e-cep.org/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2012.55.11.430>
115. Diaz-Ordoñez L, Candelo E, Silva-Cuero K, Saldarriaga W, Murgašová L, Magner M, et al. Hearing Loss in Patients With Morquio Syndrome: Protocol for a Scoping Review. *JMIR Res Protoc* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2024 Nov 16];11(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35671071/>
116. Kubaski F, Tomatsu S, Patel P, Shimada T, Xie L, Yasuda E, et al. Non-invasive pulmonary function test on Morquio patients. *Mol Genet Metab*. 2015 Aug 1;115(4):186–92.
117. John RM, Hunter D, Swanton RH. Echocardiographic abnormalities in type IV mucopolysaccharidosis. *Arch Dis Child* [Internet]. 1990 Jul 1 [cited 2024 Nov 16];65(7):746–9. Available from: <https://adc.bmj.com/content/65/7/746>
118. Henn BM, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. The great human expansion. *Resonance* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2024 Nov 9];24(6):711–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12045-019-0830-4>
119. Dũng VC, Tomatsu S, Montañó AM, Gottesman G, Bober MB, Mackenzie W, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: correlation between genotype, phenotype and keratan sulfate levels. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Nov 7];110(1–2):129–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23876334/>
120. Morris CP, Guo XH, Apostolou S, Hopwood JJ, Scott HS. Morquio A syndrome: cloning, sequence, and structure of the human N-acetylgalactosamine 6-sulfatase (GALNS) gene.

- Genomics [Internet]. 1994;22(3):652–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001980>
121. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* [Internet]. 2015 May 8 [cited 2024 Nov 19];17(5):405. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4544753/>
  122. Tomatsu S, Montaña AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Peña OM, Trandafirescu GG, et al. Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Human Mutation*. 2005.
  123. Tapiero-Rodriguez SM, Guio JCA, Porras-Hurtado GL, García N, Solano M, Pachajoa H, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. *Application of Clinical Genetics*. 2018;
  124. Pachajoa H, Ruiz-Botero F, Hernández-Amariz MF, Eichler S, Castillo-Giraldo AO. Síndrome de Morquio: nueva mutación del gen GALNS en dos hermanos del sur-occidente colombiano. *Análisis clínico, molecular y bioinformático. Revista Mexicana de Pediatría*. 2016 Sep 5;83(3):85–92.
  125. Venselaar H, te Beek TAH, Kuipers RKP, Hekkelman ML, Vriend G. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2010;11(1):548. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-548>
  126. Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, et al. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet*. 2010;
  127. Moreno Giraldo LJ, Escudero Rodríguez ÁM, Sánchez Gómez A, Satizabal Soto JM. Clinical and molecular characteristics of colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA, and description of a new galns gene mutation. *Mol Genet Metab Rep* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Nov 8];16:53. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6072674/>
  128. Bunge S, Kleijer WJ, Tylki-Szymanska A, Steglich C, Beck M, Tomatsu S, et al. Identification of 31 novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene reveals excessive allelic heterogeneity among patients with Morquio A syndrome. *Hum Mutat* [Internet]. 1997 Jan 1;10(3):223–32. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)10:3<223::AID-HUMU8>3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:3<223::AID-HUMU8>3.0.CO)
  129. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, et al. Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat* [Internet]. 2004 [cited 2024 Nov 7];24(2):187–8. Available from: <https://nemours.elsevierpure.com/en/publications/mucopolysaccharidosis-iva-morquio-a-identification-of-novel-commo>

130. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [cited 2024 Oct 21]. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
131. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Oct 21];32(19):3047–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
132. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Oct 21];34(17):i884–90. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
133. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* [Internet]. 2009 Jul [cited 2024 Oct 21];25(14):1754–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19451168/>
134. Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2024 Oct 21];32(2):292–4. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566>
135. Broad Institute. <http://broadinstitute.github.io/picard>. Picard Toolkit.
136. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2024 Oct 21];20(9):1297–303. Available from: <https://genome.cshlp.org/content/20/9/1297.full>
137. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Oct 21];10(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33590861/>
138. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Oct 21];34(12):3299–302. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx248>
139. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 2005;
140. Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J Med Genet* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2024 Nov 20];41(6):445–9. Available from: <https://jmg.bmj.com/content/41/6/445>
141. Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: The example of Triple-A syndrome. *J Med Genet*. 2004;
142. Hudson RR, Kaplan NL. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* [Internet]. 1985 [cited 2024 Nov 18];111(1):147–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4029609/>

143. Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, Ch'Ang LY, et al. The International HapMap Project. *Nature* 2004 426:6968 [Internet]. 2003 Dec 18 [cited 2024 Nov 18];426(6968):789–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature02168>
144. Iwata H, Tomatsu S, Fukuda S, Uchiyama A, Rezvi GMM, Ogawa T, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: polymorphic haplotypes and informative RFLPs in the Japanese population. *Hum Genet.* 1995;
145. Rezvi GMM, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Cooper A, Wraith JE, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: A comparative study of polymorphic DNA haplotypes in the Caucasian and Japanese populations. *J Inherit Metab Dis.* 1996;
146. Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A, Wraith JE, Yamagishi A, Kato Z, et al. Fifteen polymorphisms in the N-acetylgalactosamine 6-sulfate Sulfatase (GALNS) gene: Diagnostic implications in morquio disease. *Hum Mutat.* 1998;
147. Bochernitsan AN, Brusius-Facchin AC, Couto RR, Kubaski F, dos Santos Lopes SS, Gondim CE, et al. Spectrum of GALNS mutations and haplotype study in Brazilian patients with Mucopolysaccharidosis type IVA. *Meta Gene.* 2018;
148. Red Cultural del Banco de la República en Colombia. <https://www.banrepcultural.org/rutas-colonizacion-antioquena/images/Colonizacion.pdf>. Proceso de la colonización antioqueña.
149. Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, et al. Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 May 9 [cited 2024 Nov 9];103(19):7234. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1464326/>
150. Gravel S. Population Genetics Models of Local Ancestry. *Genetics* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2024 Nov 9];191(2):607–19. Available from: <https://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.139808>
151. Slatkin M. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. *Am J Hum Genet.* 2004;
152. Fiore M, Pillois X, Nurden P, Nurden AT, Austerlitz F. Founder effect and estimation of the age of the French Gypsy mutation associated with Glanzmann thrombasthenia in Manouche families. *European Journal of Human Genetics.* 2011;
153. Pachajoa H, Rodríguez CA, Isaza C. Possible case of Morquio syndrome in the pottery of Tumaco-Tolita culture. *Rev Neurol.* 2009;48(1):52.
154. Rezvi GMM, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Cooper A, Wraith JE, et al. Mucopolysaccharidosis IVA: A comparative study of polymorphic DNA haplotypes in the Caucasian and Japanese populations. *J Inherit Metab Dis.* 1996;
155. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genet*

- [Internet]. 2007 [cited 2024 Nov 21];81(3):559. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1950838/>
156. Moreno-Mayar JV. FrAnTK: a Frequency-based Analysis ToolKit for efficient exploration of allele sharing patterns in present-day and ancient genomic datasets. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [Internet]. 2022 Jan 4 [cited 2024 Nov 21];12(1). Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/g3journal/jkab357>
  157. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* [Internet]. 2009 Sep [cited 2024 Nov 18];19(9):1655. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2752134/>
  158. Schönherr S, Weissensteiner H, Kronenberg F, Forer L. Haplogrep 3 - an interactive haplogroup classification and analysis platform. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2023 Jul 5 [cited 2024 Oct 30];51(W1):W263–8. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkad284>
  159. Browning BL, Tian X, Zhou Y, Browning SR. Fast two-stage phasing of large-scale sequence data. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2021 Oct 7 [cited 2024 Nov 21];108(10):1880–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34478634/>
  160. Hilmarsson H, Kumar AS, Rastogi R, Bustamante CD, Montserrat DM, Ioannidis AG. High Resolution Ancestry Deconvolution for Next Generation Genomic Data. *bioRxiv* [Internet]. 2021 Sep 21 [cited 2024 Nov 21];2021.09.19.460980. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.19.460980v1>
  161. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, Zakharia F, Sikora M, Contreras A V., et al. The Genetics of Mexico Recapitulates Native American Substructure and Affects Biomedical Traits. *Science* [Internet]. 2014 [cited 2024 Nov 19];344(6189):1280. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4156478/>
  162. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: Geographic Structure, Phenotypic Diversity and Self-Perception of Ancestry Based on 7,342 Individuals. *PLoS Genet* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2024 Nov 18];10(9):e1004572. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4177621/>
  163. Lawson DJ, Hellenthal G, Myers S, Falush D. Inference of Population Structure using Dense Haplotype Data. *PLoS Genet* [Internet]. 2012 Jan [cited 2024 Nov 18];8(1):e1002453. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002453>
  164. Ossa H, Aquino J, Pereira R, Ibarra A, Ossa RH, Pérez LA, et al. Outlining the ancestry landscape of Colombian admixed populations. *PLoS One* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Nov 12];11(10). Available from: <https://hdl.handle.net/20.500.12495/2303>





## ANEXO 1: CONSENTIMIENTO Y ASENTIMIENTO INFORMADO

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del proyecto:** Efecto fundador de la mutación p.G301C en pacientes colombianos con mucopolisacaridosis tipo IVA

**Investigador principal:** Lorena Díaz Pachajoa

**Director de proyecto:** Harry

**Instituciones ejecutoras:** Universidad Icesi – Universidad del Valle

#### Introducción

Este proyecto de investigación es importante porque permitirá la identificación de aspectos clínicos y moleculares para mejorar la detección, el diagnóstico, y la prevención de la mucopolisacaridosis tipo IVA o Síndrome de Morquio en Colombia. El objetivo de este documento es asegurarle que todos los derechos como participante humano, serán respetados durante todas las etapas de la investigación. A continuación, se realizará una descripción de los puntos más importantes de la investigación y ante cualquier inquietud por favor no dude en preguntarle al coordinador o algún miembro del equipo investigador, solo después que hayan sido contestadas todas sus preguntas podrá decidir si participa o no. Una copia de este consentimiento le será entregada al final del proceso.

1. ¿Cuál es el objetivo de este estudio?

Este estudio pretende determinar las características clínicas y moleculares en por lo menos 100 personas con mucopolisacaridosis IVA en Colombia, con el fin de contribuir a la comprensión de la mucopolisacaridosis tipo IVA en Colombia.

2. ¿Usted tiene que participar?

No, su participación es estrictamente voluntaria y puede retirarse del estudio en cualquier momento. Su retiro no perjudica la atención en salud a la cual tiene derecho.

3. ¿Por qué lo estamos invitando a participar?

El síndrome de Morquio es una enfermedad que se caracteriza por rigidez articular, malformaciones óseas, retardo del crecimiento, déficit pulmonar, anomalías hepáticas, oculares, cardíacas, dentales y en algunos casos neurológicas. Esta enfermedad es causada por la acumulación de productos de desecho dentro de las células, lo cual se debe a cambios en el gen que proporciona instrucciones para fabricar la proteína encargada de degradar dichos productos. En Colombia existe un vacío de conocimiento en cuanto a la prevalencia, distribución geográfica y características moleculares de la patología. Nuestro estudio pretende llenar ese vacío y caracterizar estos aspectos en nuestro país. Este estudio se puede realizar tomando una muestra de sangre ya que no existe ninguna otra alternativa para obtener la información genética necesaria.

4. ¿Qué pasará durante el estudio?

- Registro de datos sociodemográficos: se realizarán preguntas como nombre, identificación, edad, sexo, lugar de origen, lugar de origen de los padres y abuelos. Toda la información se anotará en un formulario específico. En caso de no sentir conformidad con alguna de las preguntas, esta podrá ser dejada en blanco. Esta primera parte tomará alrededor de 10 minutos.
- Examen físico: se realizará una evaluación médica para establecer las características clínicas. Esta segunda parte durará alrededor de 40 minutos. Si usted hace parte del grupo control, este examen no será realizado.
- Toma de fotografías: si el médico considera necesaria la documentación fotográfica de alguna parte de su cuerpo y usted acepta voluntariamente que se tomen dichas fotos, esta parte tomará alrededor de 10 minutos.
- Toma de muestra de sangre: se le tomará una muestra de sangre, en cantidad aproximada de 4 cucharadas soperas para realizar el examen genético (4mL). La

muestra de ADN obtenida a partir de su muestra de sangre será guardada en el Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Icesi para su utilización en este estudio y en otros relacionados con enfermedades de depósito lisosomal. Esta última parte tomará alrededor de 8 minutos.

5. ¿Cuáles son los riesgos de participar en este estudio?

La molestia que usted sentirá es dolor por el pinchazo de la aguja, podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja. Sin embargo, este riesgo es mínimo, ya que contamos con personal altamente calificado para realizar esta labor. Adicionalmente, el personal encargado del procedimiento deberá tener en cuenta las siguientes recomendaciones (tenga en cuenta que la flebitis se refiere a la inflamación de su vena):

- Para evitar la aparición de hematomas o morados:
  - Ingresar la aguja en el ángulo correcto
  - Evitar buscar la vena con la aguja dentro de la misma
  - Retirar el torniquete antes de retirar la aguja
  - Al finalizar el procedimiento, solicitar elevar el brazo sin doblarlo
- Para evitar la respuesta vasovagal o desmayos
  - Disminuir la ansiedad.
  - Transmitir confianza
  - No decir a los participantes que el procedimiento no es doloroso, ya que lo es.
  - Indicar que es un procedimiento necesario y además de corta duración.
- Para evitar la flebitis mecánica
  - Insertar la aguja en el ángulo adecuado
  - Elegir una vena de buen calibre y con la menor tortuosidad posible
  - No realizar la punción en una vena multipuncionada
- Para evitar la flebitis química
  - Utilizar alcohol antiséptico al 70% para desinfectar la zona de punción
  - Dejar secar el alcohol ANTES de realizar la punción
  - Colocar algodón SECO al finalizar el procedimiento
- Para evitar la flebitis infecciosa
  - Los materiales utilizados deben ser estériles
  - Realizar un correcto lavado de manos
  - Realizar la técnica aséptica (limpieza con alcohol) apropiada

6. ¿Cuáles son los beneficios de participar?

No existe un beneficio directo para usted. Sin embargo, con los resultados que se obtengan de este estudio, podremos mejorar, en el futuro, el abordaje diagnóstico y terapéutico de la mucopolisacaridosis tipo IVA. Adicionalmente, si usted hace parte del grupo de pacientes con síndrome de Morquio, a través de los resultados de este estudio se podrá establecer el pronóstico y orientar el asesoramiento genético de su familia.

7. ¿Usted obtendrá algún beneficio económico o retribución por participar?

No, el estudio no comprende ningún tipo de incentivo, bono o aporte económico a cambio de su participación, esta es completamente voluntaria y no habrá retribución material en su beneficio.

8. ¿Su participación en este estudio es confidencial?

Sí, toda la información será estrictamente confidencial y no se revelará ninguna información que pueda identificarlo. Su nombre será reemplazado por un código. En este estudio se han adoptado todas las medidas necesarias para proteger la privacidad e intimidad del participante. Los investigadores garantizan que toda la información recogida para el estudio será examinada únicamente por el equipo investigador y por los entes reguladores, cuando así lo requieran.

9. ¿Qué se hará con los resultados de esta investigación?

Los resultados de este estudio servirán para recopilar información sobre las características clínicas y moleculares de la mucopolisacaridosis tipo IVA. Se espera publicar artículos académicos en revistas científicas, así como realizar presentaciones en congresos médicos con el fin de socializar a la comunidad científica los hallazgos obtenidos.

Si usted hace parte del grupo de pacientes con MPS IVA, el equipo de investigación ha decidido informarlo sobre los resultados de la prueba molecular para que pueda conocer la causa de su enfermedad.

Si usted hace parte del grupo de controles, no será informado de los resultados obtenidos en el estudio. Sin embargo, en caso de que durante el transcurso de esta investigación se encuentren evidencias de que usted se beneficiaría directamente de conocer estos resultados, usted será informado.

10. ¿A quién puedo contactar?

Si usted tiene alguna duda durante el tiempo de permanencia en el estudio, puede contactar a Lorena Díaz (investigadora principal) al teléfono 3185601744 o 5552334 ext. 8542, al Dr. Harry Pachajoa al celular 3005757597 o al 3319090 ext. 8075 o al Dr. Wilmar Saldarriaga Gil al celular 3182800698.

Si usted tiene alguna queja sobre este estudio, puede contactarse con el presidente del Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi al teléfono 5552334 o al Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (CIREH) al teléfono 5185677 o al correo electrónico [eticasalud@correounivalle.edu.co](mailto:eticasalud@correounivalle.edu.co)

**CÓDIGO DE PARTICIPANTE**

| FECHA |     |     |
|-------|-----|-----|
| DIA   | MES | AÑO |
|       |     |     |

|                                                                                                                                 |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Nombre(s) y apellido(s) del participante                                                                                        |  |
| Nombre(s) y apellido(s) del Representante Legal o acudiente (menores de edad o personas en situación de discapacidad cognitiva) |  |
| Nombre(s) y apellido(s) del investigador responsable                                                                            |  |

**CONSENTIMIENTO**

Yo, \_\_\_\_\_, manifiesto que tras haber recibido información verbal clara y sencilla y haber leído y entendido la información anterior, he podido preguntar y aclarar todas mis dudas he tomado consciente y libremente la decisión de participar del estudio. También se me ha indicado que puedo tener una copia de este documento y que puedo retirar mi participación en cualquier momento.

Así mismo, he sido informado de que el material biológico puede también ser utilizado para la investigación en el conocimiento de mi enfermedad y otras enfermedades metabólicas, siempre de acuerdo con las regulaciones y normas éticas vigentes y que, aunque mis resultados pueden no proporcionar información útil para mí o mi familia actualmente, pueda proporcionarla en un futuro.

Autorizo mi consentimiento para: marcar con una X, en cada caso.

Que se me extraiga una muestra de sangre para obtención de ADN para investigar la mucopolisacaridosis tipo IVA en este estudio.

Que se me contacte en el futuro en caso de que producto de la investigación se encuentre alguna información de interés para mi caso particular o para consultar mi participación en futuros proyectos relacionados con la mucopolisacaridosis tipo IVA y otras enfermedades metabólicas.

Que se conserve y utilice posteriormente mi ADN para investigación relacionada con la mucopolisacaridosis tipo IVA y otras enfermedades metabólicas.

Que se tomen fotografías de una o más partes de mi cuerpo, entendiendo que esta información puede utilizarse para documentación clínica y, de forma anónima, sin otros datos personales, para la docencia o para su publicación de textos o revistas médicas.

Que se utilicen los resultados de la investigación y la información recolectada en otros estudios de investigación similares futuros, previa autorización de los respectivos Comités de Ética de las dos Universidades.

Confirmando que he recibido una copia física del presente documento

SI NO

|  |  |
|--|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Firma del Paciente  
(Tutor o representante legal)

Firma del investigador  
(Responsable de la información)

N° Identificación: \_\_\_\_\_

Tarjeta profesional: \_\_\_\_\_

**TESTIGOS**

| FECHA |     |     |
|-------|-----|-----|
| DIA   | MES | AÑO |
|       |     |     |

**Testigo 1**

Yo, \_\_\_\_\_, con mi firma certifico que estuve presente durante la discusión en el proceso de consentimiento informado, todas las dudas fueron resueltas satisfactoriamente y la participación es voluntaria por parte del participante.

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Dirección del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Número de identificación

\_\_\_\_\_  
Parentesco con el voluntario

**Testigo 2**

Yo, \_\_\_\_\_, con mi firma certifico que estuve presente durante la discusión en el proceso de consentimiento informado, todas las dudas fueron resueltas satisfactoriamente y la participación es voluntaria por parte del participante.

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Dirección del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Número de identificación

\_\_\_\_\_  
Parentesco con el voluntario

**REVOCATORIA DEL CONSENTIMIENTO**

| FECHA |     |     |
|-------|-----|-----|
| DIA   | MES | AÑO |
|       |     |     |

Yo, \_\_\_\_\_, de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

Firma del Paciente  
(Familiar o representante legal en caso de incapacidad)

C.C.

Firma del Médico  
(Responsable de la información)

T.P.



**ASENTIMIENTO INFORMADO**  
**Para menores de edad entre 7 y 18 años de edad**

**Título del proyecto:** Efecto fundador de la mutación p.G301C en pacientes colombianos con mucopolisacaridosis tipo IVa

**Investigador principal:** Lorena Díaz Pachajoa

**Director de proyecto:** Harry

**Instituciones encargadas:** Universidad Icesi – Universidad del Valle

## Introducción

Esta investigación es importante porque va a permitir conocer elementos médicos para poder descubrir, comunicar y evitar la enfermedad de Síndrome de Morquio o mucopolisacaridosis tipo IVA en Colombia. Con esta lectura se promete que tus derechos serán protegidos y respetados durante todo el tiempo que se realice la investigación.

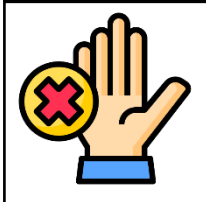


Ahora, se van a explicar los puntos más importantes de la investigación, si tienes alguna pregunta puedes pedirle ayuda a las personas que están haciendo la investigación. Cuando respondas todas las preguntas se decide si puedes participar o no. Al terminar con esta actividad se te va a entregar una copia de esta lectura.



### 11. ¿Por qué se realiza este estudio?

Este estudio se realiza porque se quiere conocer más sobre el Síndrome de Morquio en Colombia para poder entender mejor esta enfermedad.



### 12. ¿Es obligatorio participar?

No, no es obligatorio participar, si participas es porque quieres hacerlo, y si no quieres participar más te puedes salir del estudio en cualquier momento. Esto no afecta la atención en salud.



### 3. ¿Por qué queremos que participe?

Las personas con Síndrome de Morquio tienen dolor en las articulaciones (muñecas o codos), su crecimiento es más lento, tienen dificultad para respirar y otros síntomas más. Esta enfermedad aparece porque algunas partes del cuerpo de las personas están fallando o no están funcionando bien.

En Colombia hay poca información sobre el Síndrome de Morquio, este estudio quiere buscar y conseguir más información sobre esta enfermedad.

Para poder realizar este estudio se necesita tomar muestras de sangre porque es la única forma de conseguir la información que se necesita.

## 4. ¿Cuáles son los pasos del estudio?



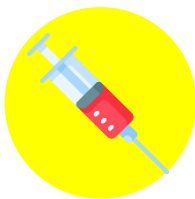
**Paso 1. Registro de datos personales:** se hacen preguntas de tu nombre, edad, género, lugar de nacimiento, lugar de nacimiento de padres y abuelos. Toda esta información se va anotando en un escrito especial. Si no sabes cómo responder alguna pregunta no es necesario que la respondas. Este primer paso va a durar 10 minutos.



**Paso 2. Examen físico:** se hace un examen para saber cómo está tu salud. Este paso va a durar 40 minutos. Si ya estás dentro del estudio, esta revisión no se realiza.



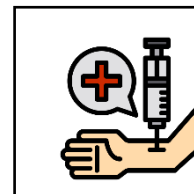
**Paso 3. Toma de fotografías:** si el médico necesita tomar fotografías de alguna parte de tu cuerpo y si aceptas que te tomen estas fotografías porque tú quieres, entonces este paso va a durar 10 minutos.



**Paso 4. Toma de muestra de sangre:** Se va a tomar una muestra de sangre, esta muestra de sangre son como 4 cucharadas. De la muestra de sangre se saca una muestra de ADN y esta muestra será guardada en un laboratorio de la Universidad Icesi para usarla en el estudio y en otros estudios parecidos. Este paso va a durar 8 minutos.

#### 5. ¿Cuáles son los peligros al participar de este estudio?

Solo vas a sentir un poco de dolor cuando seas pinchado por la aguja y puede aparecer un morado en donde se inserta la aguja. Hay poco peligro porque las personas que toman las muestras de sangre hacen muy bien su trabajo. Las personas que toman las muestras deben seguir estas recomendaciones:

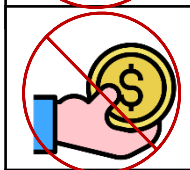


- **Para que no aparezcan morados:**
  - Ingresar la aguja en el ángulo correcto.
  - No buscar la vena con la aguja dentro de la vena.
  - Quitar la cinta elástica antes de sacar la aguja.
  - Al terminar, pedir que se levante el brazo sin doblarlo.
- **Para no desmayarse:**
  - Disminuir la ansiedad.
  - Transmitir confianza.
  - No decir a los participantes que no van a sentir dolor, porque si pueden sentir dolor.
  - Decir que se necesita de la muestra de sangre y dura muy poco tiempo.
- **Para evitar que la vena se inflame:**
  - Insertar la aguja en el ángulo adecuado.
  - Elegir una vena de buen tamaño y con pocas curvas.
  - No insertar la aguja en una vena que ya fue pinchada.
- **Para evitar que la zona en donde se inserta la aguja se ponga roja o se irrite:**
  - Utilizar alcohol para desinfectar el lugar de la vena.
  - Dejar secar el alcohol ANTES de insertar la aguja.
  - Colocar algodón SECO cuando terminen de tomar la muestra de sangre.
- **Para evitar la vena se infecte:**
  - Los materiales utilizados deben estar limpios.
  - Lavar muy bien las manos.
  - Limpiar con alcohol donde se inserta la aguja.



#### 6. ¿Vas a recibir algo a cambio por participar en este estudio?

No, no vas a recibir nada a cambio por participar. Pero la información que se encuentre puede ayudar a las personas con Síndrome de Morquio. Si eres una persona con Síndrome de Morquio, con la información que se encuentre en el estudio puedes recibir más información sobre la enfermedad.



#### 7. ¿Voy a recibir dinero si participo en el estudio?

No, no vas a recibir nada de dinero por participar en el estudio. Tu participación es voluntaria, es decir que participas porque tú quieres hacerlo.



#### 8. ¿La participación en este estudio es privada?

Sí, toda la información del estudio es privada y no se puede usar tu información personal. Tu nombre será cambiado por un código. Se protegen tus datos como participante y solo los investigadores pueden conocer y usar tu información en el estudio cuando sea necesario.



#### 9. ¿Qué se hará con la información de esta investigación?

Lo que se descubra en el estudio sirve para conseguir más información sobre el Síndrome de Morquio. Se pueden realizar artículos, revistas o charlas para que otras personas conozcan la información que se encuentre en el estudio.

Si tienes Síndrome de Morquio las personas que realizan la investigación te pueden compartir la información que encuentren y puedas entender por qué tienes la enfermedad.

Si estas en el grupo de controles, no vas a conocer la información que se encuentre en el estudio. Pero si hay información que te puede ayudar de alguna forma, entonces las personas que realizan la investigación te la pueden compartir.



#### 9. ¿A quién puedo llamar?

Si tienes alguna pregunta durante el tiempo que se realiza el estudio, puedes llamar a Lorena Díaz (investigadora principal) al teléfono 3185601744 o 5552334 extensión 8542, al Doctor Harry Pachajoa al celular 3005757597 o al 3319090 extensión 8075 o al Doctor Wilmar Saldarriaga Gil al celular 3182800698.

Si tienes alguna queja sobre este estudio, puedes llamar al presidente del Comité de Ética de Investigación Humana de la Universidad Icesi al teléfono 5552334 o al Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (CIREH) al teléfono 5185677 o al correo electrónico [eticasalud@correounivalle.edu.co](mailto:eticasalud@correounivalle.edu.co)

#### CÓDIGO DE PARTICIPANTE

|                                                                                                                                 | FECHA |     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-----|
|                                                                                                                                 | DÍA   | MES | AÑO |
| Nombre(s) y apellido(s) del participante                                                                                        |       |     |     |
| Nombre(s) y apellido(s) del Representante Legal o acudiente (menores de edad o personas en situación de discapacidad cognitiva) |       |     |     |
| Nombre(s) y apellido(s) del investigador responsable                                                                            |       |     |     |

#### ASENTIMIENTO

Yo, \_\_\_\_\_, afirmo que después de escuchar la información de forma clara, de leer y entender la información anterior, he preguntado y me han explicado lo que no entiendo, decido participar en este estudio porque quiero hacerlo. También me mencionaron que me van a entregar una copia de esta lectura y me puedo salir del estudio en cualquier momento.

Igual, me mencionaron que las tomas de muestra de sangre pueden ser usadas para conocer más sobre la enfermedad o enfermedades parecidas teniendo en cuenta las normas éticas, y que, la información que encuentren en el estudio puede no servirme a mí o a mi familia ahora, pero puede servir luego, en el futuro.

Doy mi permiso para: marcar con una X, en cada párrafo.



Tomarme una muestra de sangre para sacar una muestra de ADN para conocer más sobre el Síndrome de Morquio en este estudio.



Llamarme en el futuro si en la investigación se encuentra información que sea importante para mí o para pedir mi participación en otros estudios relacionados con el Síndrome de Morquio o de enfermedades parecidas.



Guardar y usar mi muestra de sangre en la investigación sobre el Síndrome de Morquio y de enfermedades parecidas.



Tomarme fotografías de una o más partes de mi cuerpo, para que se pueda guardar como muestras médicas, y manteniendo en privado mis datos personales si la información del estudio se les comparte a otras personas.

SI NO

|  |  |
|--|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |



Utilizar la información encontrada de esta investigación y la información encontrada en otros estudios parecidos, con la autorización necesaria de los Comités de Ética de las dos Universidades encargadas.

Confirmando que me han entregado una copia física de esta lectura.

|  |  |
|--|--|
|  |  |
|  |  |

Firma del Paciente  
N° Identificación: \_\_\_\_\_

Firma del investigador  
(Responsable de la información)  
Tarjeta profesional: \_\_\_\_\_

## TESTIGOS

| FECHA |     |     |
|-------|-----|-----|
| DIA   | MES | AÑO |
|       |     |     |

### Testigo 1

Yo, \_\_\_\_\_, con mi firma aseguro que estuve presente durante la conversación del asentimiento informado, todas las preguntas fueron explicadas y el participante va a participar en el estudio porque quiere hacerlo.

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Dirección del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Número de identificación

\_\_\_\_\_  
Parentesco con el voluntario

### Testigo 2

Yo, \_\_\_\_\_, con mi firma aseguro que estuve presente durante la conversación del asentimiento informado, todas las preguntas fueron explicadas y el participante va a participar en el estudio porque quiere hacerlo.

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Dirección del testigo 2

\_\_\_\_\_  
Número de identificación

\_\_\_\_\_  
Parentesco con el voluntario

## REVOCATORIA DEL ASENTIMIENTO

| FECHA |     |     |
|-------|-----|-----|
| DIA   | MES | AÑO |
|       |     |     |

Yo, \_\_\_\_\_, de forma libre y entendiendo lo que hago, decido dejar de participar en el estudio. Acepto las consecuencias que se puedan tener para la salud o la vida.

Firma del Paciente  
(Familiar o representante legal en caso de incapacidad)

C.C.

Firma del Médico  
(Responsable de la información)

T.P

## ANEXO 2: DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS

### ENCUESTA EFECTO FUNDADOR DE LA MUTACIÓN p.G301C EN PACIENTES COLOMBIANOS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA

**Código participante**

#### Datos personales

|                          |  |                      |  |                           |                        |                      |                  |            |  |
|--------------------------|--|----------------------|--|---------------------------|------------------------|----------------------|------------------|------------|--|
| Dirección de residencia  |  |                      |  |                           | Teléfono               |                      |                  |            |  |
|                          |  |                      |  |                           |                        |                      |                  |            |  |
| Correo electrónico       |  |                      |  | Sexo                      |                        | Fecha nacimiento     |                  | Edad       |  |
|                          |  |                      |  | M                         |                        | F                    |                  | Otro       |  |
| Régimen de afiliación    |  |                      |  |                           |                        |                      |                  |            |  |
| No afiliado              |  | Subsidado            |  | Contributivo              |                        | Prepagada            |                  | Especiales |  |
| Departamento nacimiento  |  | Ciudad de nacimiento |  | Departamento residencia   |                        | Ciudad de residencia |                  | Estrato    |  |
|                          |  |                      |  |                           |                        |                      |                  |            |  |
| Grupo étnico             |  |                      |  |                           | Dpto. nacimiento madre |                      | Ciudad nto madre |            |  |
| Mestizo                  |  | Afro                 |  | Blanco                    |                        | Indígena             |                  | Otro       |  |
| Dpto. nto abuela materna |  | Ciudad nto abuela    |  | Observaciones adicionales |                        |                      |                  |            |  |
|                          |  |                      |  |                           |                        |                      |                  |            |  |

#### Datos clínicos

|                                                                            |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
|----------------------------------------------------------------------------|--|----------------------|--|-----------------------|-------------------------------------|-----------------|--|-------|-------------|--------------|----|
| Edad sospecha clínica                                                      |  | Edad del diagnóstico |  | Método de diagnóstico |                                     |                 |  |       |             |              |    |
|                                                                            |  |                      |  | Enzimático            |                                     | Molecular       |  | uGAG  |             | No realizado |    |
| Actividad enzimática reportada (si aplica)                                 |  |                      |  |                       | Nivel de uGAG reportado (si aplica) |                 |  |       |             |              |    |
|                                                                            |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
| Si tiene diagnóstico molecular, escriba las variantes genéticas reportadas |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
| Alelo 1                                                                    |  | c.                   |  | p.                    |                                     | Alelo 2         |  | c.    |             | p.           |    |
| Describa los primeros hallazgos que orientaron la sospecha clínica         |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
|                                                                            |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
|                                                                            |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
|                                                                            |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
| Recibe tratamiento                                                         |  | Fecha de inicio      |  | Fecha termina         |                                     | Frecuencia      |  |       | Continuidad |              |    |
| Si                                                                         |  | No                   |  |                       |                                     |                 |  |       | Si          |              | No |
| Razón de discontinuidad                                                    |  |                      |  |                       |                                     |                 |  |       |             |              |    |
| Personales                                                                 |  | Relacionados con EPS |  | Reacciones adversas   |                                     | Decisión médica |  | Otros |             |              |    |

### ANEXO 3: DATOS CLÍNICOS

#### EXAMEN MÉDICO EFECTO FUNDADOR DE LA MUTACIÓN p.G301C EN PACIENTES COLOMBIANOS CON MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IVA

**Código participante**

#### Examen físico

|                               |              |    |                    |                      |       |                |            |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
|-------------------------------|--------------|----|--------------------|----------------------|-------|----------------|------------|-----|---------------------------------------------|---------------|----|-------------------------------------------|--------------------|----|-------------|----------------------|----|----|
| Perímetro cefálico (cm)       | Macrocefalia |    |                    | Peso (kg)            |       |                | Talla (cm) |     |                                             | Estatura baja |    |                                           | Opacidad corneal   |    |             | Facies toscas        |    |    |
|                               | Si           |    | No                 |                      |       |                |            |     |                                             | Si            |    | No                                        | Si                 |    | No          | Si                   |    | No |
| Cuello corto                  | Prognatismo  |    |                    | Escala de mallampati |       |                |            |     |                                             | Maloclusión   |    |                                           | Hipoplasia esmalte |    |             | Hipertrofia tonsilar |    |    |
| Si                            |              | No | Si                 |                      | No    | I              | II         | III | IV                                          | Si            |    | No                                        | Si                 |    | No          | Si                   |    | No |
| Dientes supernumerarios       |              |    | Dientes espaciados |                      |       | Gingivitis     |            |     | Frenillo labial alto                        |               |    | Macroglosia                               |                    |    | Hipertrofia |                      |    |    |
| Si                            |              | No | Si                 |                      | No    | Si             |            | No  | Si                                          |               | No | Si                                        |                    | No | Si          |                      | No |    |
| Hernias                       |              |    | Hernias detectadas |                      |       |                |            |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
| Si                            |              | No |                    |                      |       |                |            |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
| Desviación cubital muñecas    |              |    | Pectus carinatum   |                      |       | Tórax en tonel |            |     | Cifosis toracolumbar                        |               |    | Escoliosis                                |                    |    | Genu valgum |                      |    |    |
| Si                            |              | No | Si                 |                      | No    | Si             |            | No  | Si                                          |               | No | Si                                        |                    | No | Si          |                      | No |    |
| Articulaciones hiperlaxas     |              |    |                    |                      |       |                |            |     | Articulaciones con rigidez                  |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
|                               |              |    |                    |                      |       |                |            |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
|                               |              |    |                    |                      |       |                |            |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
| Marcha                        |              |    | Tipo de marcha     |                      |       |                |            |     | Longitud extremidad inferior izquierda (cm) |               |    | Longitud extremidad inferior derecha (cm) |                    |    |             |                      |    |    |
| Si                            |              | No | Normal             |                      | Lenta |                | Con pausas |     |                                             |               |    |                                           |                    |    |             |                      |    |    |
| Asimetría miembros inferiores |              |    | Hepatomegalia      |                      |       | Esplenomegalia |            |     | Hiperlordosis                               |               |    | Deformidad en codos                       |                    |    | Otros       |                      |    |    |
| Si                            |              | No | Si                 |                      | No    | Si             |            | No  | Si                                          |               | No | Si                                        |                    | No |             |                      |    |    |

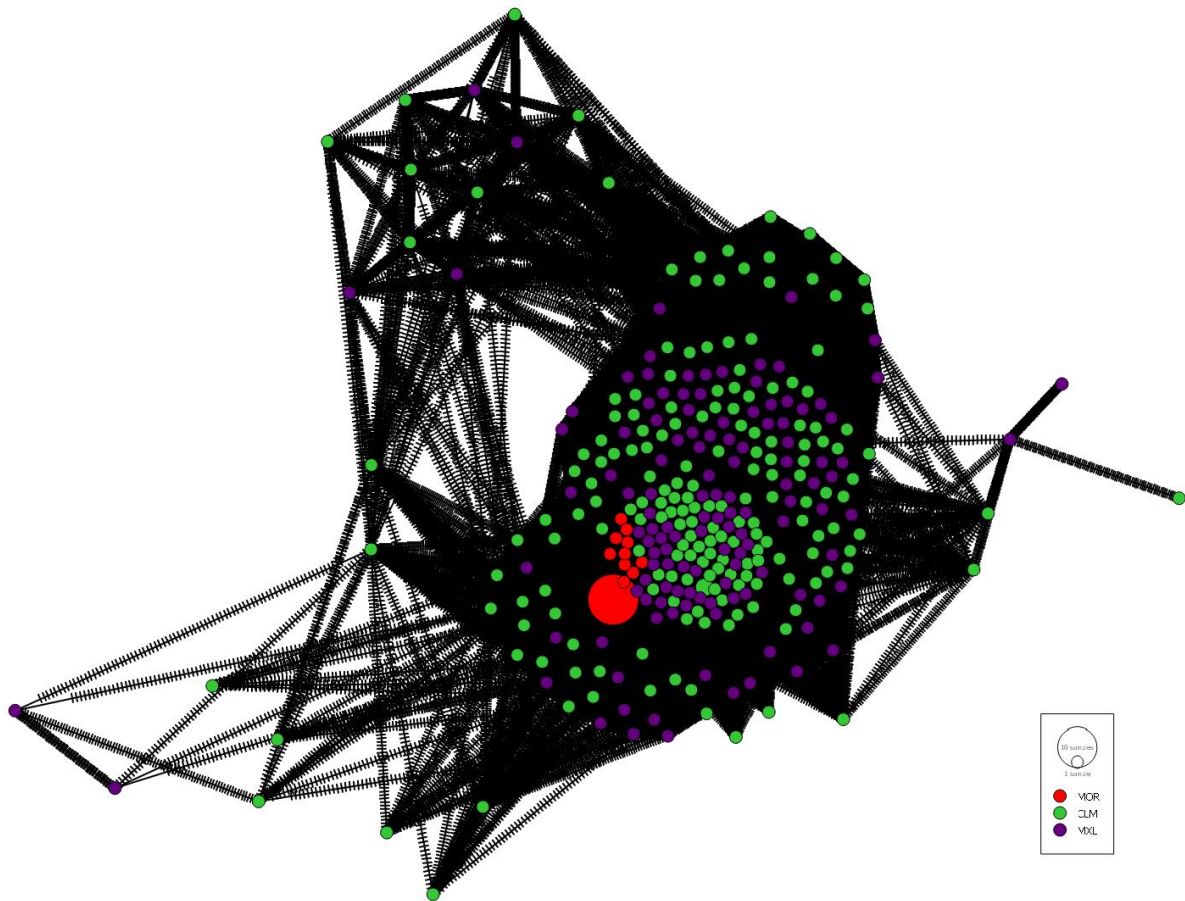
#### Historia clínica

|                       |  |                |                             |       |             |                       |             |          |                       |        |                                   |                        |  |             |                                      |        |    |
|-----------------------|--|----------------|-----------------------------|-------|-------------|-----------------------|-------------|----------|-----------------------|--------|-----------------------------------|------------------------|--|-------------|--------------------------------------|--------|----|
| Compresión medular    |  |                | Localización de compresión  |       |             | Hipoplasia odontoidea |             |          | Escoliosis            |        |                                   | Grado escoliosis       |  |             | Lateralidad escoliosis               |        |    |
| Si                    |  | No             |                             |       |             | Si                    |             | No       | Si                    |        | No                                |                        |  |             |                                      |        |    |
| Cifosis               |  |                | Grado cifosis               |       |             | Artrosis              |             |          | Tipo artrosis         |        |                                   | Luxaciones             |  |             | Tipo luxación                        |        |    |
| Si                    |  | No             |                             |       |             | Si                    |             | No       |                       |        |                                   | Si                     |  | No          |                                      |        |    |
| Hipertrofia adenoides |  |                | Potenciales evocados        |       |             | Onda I                | Onda II     | Onda III | Onda IV               | Onda V | Resultado final potencial evocado |                        |  | Audiometría |                                      |        |    |
| Si                    |  | No             | Si                          |       | No          |                       |             |          |                       |        |                                   |                        |  | Si          |                                      | No     |    |
| Umbral (dB)           |  |                | Resultado final audiometría |       |             |                       |             |          |                       |        |                                   |                        |  |             | Logoaudiometría con Impedanciometría |        |    |
|                       |  |                | Normal                      |       | Hipoacusia  | Grado hipoacusia:     |             |          |                       |        |                                   | Si                     |  | No          |                                      |        |    |
| Tipo hipoacusia       |  |                |                             |       |             | Polisomnografía       |             |          | Apnea del sueño       |        |                                   | Grado de apnea         |  |             |                                      |        |    |
| Conductiva            |  | Neurosensorial |                             | Mixta |             | Si                    |             | No       | Si                    |        | No                                | Leve                   |  | Moderada    |                                      | Severa |    |
| Espirometría          |  |                | Patron respiratorio         |       |             |                       |             |          | Ecocardiograma <1 año |        |                                   | Infiltración miocardio |  |             | Cardiomiopatía hipertrófica          |        |    |
| Si                    |  | No             | Normal                      |       | Restrictivo |                       | Obstructivo |          | Si                    |        | No                                | Si                     |  | No          | Si                                   |        | No |

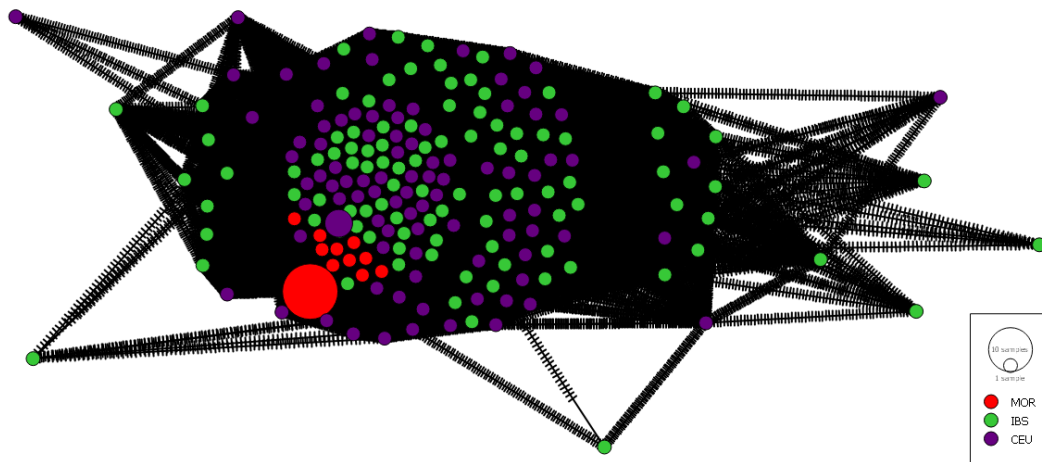
|                                      |  |    |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    |          |    |                              |  |    |  |    |  |
|--------------------------------------|--|----|---------------|-----------------------|--|--------------|--|-----------------------|-----------|----|--|------------------------------|--|----|----|----------------------------------|----|----------|----|------------------------------|--|----|--|----|--|
| Anomalías de la válvula mitral       |  |    |               | Estenosis mitral      |  |              |  | Insuficiencia mitral  |           |    |  | Anomalías válvula tricúspide |  |    |    | Estenosis tricúspide             |    |          |    | Insuficiencia tricúspide     |  |    |  |    |  |
| Si                                   |  | No |               | Si                    |  | No           |  | Si                    |           | No |  | Si                           |  | No |    | Si                               |    | No       |    | Si                           |  | No |  |    |  |
| Anomalías válvula aórtica            |  |    |               | Estenosis aórtica     |  |              |  | Insuficiencia aórtica |           |    |  | Anomalías válvula pulmonar   |  |    |    | Estenosis valv. pulmonar         |    |          |    | Insuficiencia valv. pulmonar |  |    |  |    |  |
| Si                                   |  | No |               | Si                    |  | No           |  | Si                    |           | No |  | Si                           |  | No |    | Si                               |    | No       |    | Si                           |  | No |  |    |  |
| Fracción de eyección                 |  |    |               | Otro defecto cardiaco |  |              |  |                       |           |    |  | Anomalías oculares           |  |    |    | Estrabismo                       |    |          |    | Trastornos refracción        |  |    |  |    |  |
|                                      |  |    |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  | Si                           |  |    |    |                                  | No |          | Si |                              |  |    |  | No |  |
| Trastornos refracción diagnosticados |  |    |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    | Glaucoma |    |                              |  |    |  |    |  |
| Miopia                               |  |    | Hipermetropía |                       |  | Astigmatismo |  |                       | Presbicia |    |  | Otro:                        |  |    | Si |                                  |    | No       |    |                              |  |    |  |    |  |
| Anomalías dentales                   |  |    |               | Tipo anomalía dental  |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    |          |    |                              |  |    |  |    |  |
| Si                                   |  | No |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    |          |    |                              |  |    |  |    |  |
| Adenoidectomía                       |  |    |               | Amigdalectomía        |  |              |  | Reparación hernia     |           |    |  | Tubo de ventilación auditiva |  |    |    | Ventilación mecánica no invasiva |    |          |    | Antecedentes quirúrgicos     |  |    |  |    |  |
| Si                                   |  | No |               | Si                    |  | No           |  | Si                    |           | No |  | Si                           |  | No |    | Si                               |    | No       |    | Si                           |  | No |  |    |  |
| Cirugía de caderas                   |  |    |               | Osteotomías           |  |              |  | Descompresión medular |           |    |  | Cirugía de rodillas          |  |    |    | Fijación cervical                |    |          |    | Miringocentesis              |  |    |  |    |  |
| Si                                   |  | No |               | Si                    |  | No           |  | Si                    |           | No |  | Si                           |  | No |    | Si                               |    | No       |    | Si                           |  | No |  |    |  |
| Otras cirugías                       |  |    |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    |          |    |                              |  |    |  |    |  |
|                                      |  |    |               |                       |  |              |  |                       |           |    |  |                              |  |    |    |                                  |    |          |    |                              |  |    |  |    |  |

## ANEXO 4: REDES DE HAPLOTIPOS

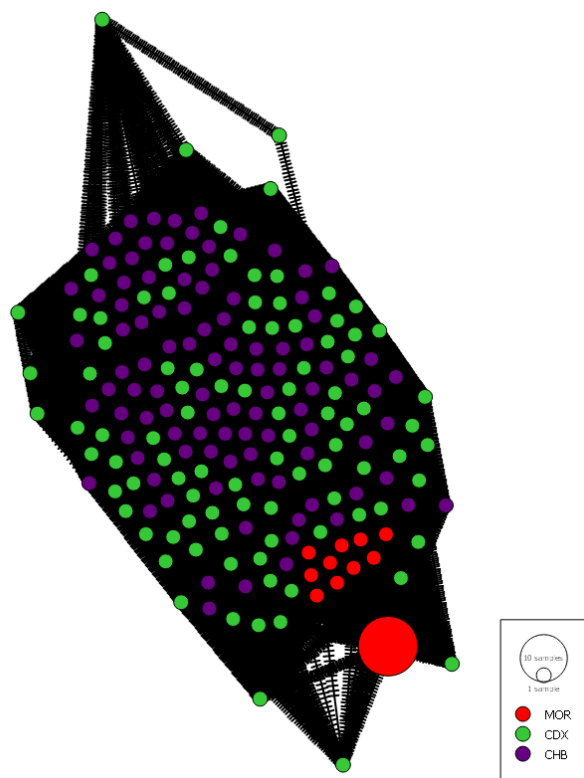
### A. Latinos



### B. Europeos



C. Asiáticos



D. Africanos

